

新規リン脂質、フィトセラミド 1-リン酸の生合
成経路と代謝、および生成酵素の解析

2017 年

喜田 孝史

目次

緒言	5
第一章.....	7
序論.....	8
第 1 節・実験方法	10
第 2 節・結果	16
第 3 節・考察	40
第二章.....	44
序論.....	45
第 1 節・実験方法	47
第 2 節・結果	49
第 3 節・考察	57
総括	60
参考文献.....	62
謝辞	69

本論文では、以下の略語を用いた。

AGP	Arabinogalactan Protein (アラビノガラクトタンタンパク質)
BCA	Bicinchoninic Acid (ビシンコニン酸)
C1P	Ceramide 1-Phosphate (セラミド 1-リン酸)
DE	Dimethyl Ether (ジエチルエーテル)
DEAE	Diethylaminoethyl (ジエチルアミノエチル)
DG	Diacylglycerol (ジアシルグリセロール)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (エチレンジアミン四酢酸)
GC	Gas Chromatography (ガスクロマトグラフィー)
GluCer	Glucosylceramide (グルコシルセラミド)
GIPC	Glycosylinositol phosphoceramide (グリコシルイノシトールホスホセラミド)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol (グリコシルホスファチジルイノシトール)
IPC	Inositol phosphoceramide (イノシトールホスホセラミド)
LC	Liquid Chromatography (液体クロマトグラフィー)
LPA	Lysophosphatidic Acid (リゾホスファチジン酸)
LPC	Lysophosphatidyl Choline (リゾホスファチジルコリン)
LPP	Lipid phosphate phosphatase (脂質リン酸ホスファターゼ)
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化)
MGI	Mannopyranosyl Glucuronopyranosyl Inositol (マンノピラノシル-グルクロンピラノシル-イノシトール)
MS	Mass Spectrometry (マススペクトロメトリー)
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry (タンデムマススペクトロメトリー)
NaDOC	Deoxycholic acid-Na (デオキシコール酸ナトリウム)
PA	Phosphatidic Acid (ホスファチジン酸)
PC	Phosphatidyl Choline (ホスファチジルコリン)
PC1P	Phytoceramide 1-Phosphate (フィトセラミド 1-リン酸)
PG	Phosphatidyl Glycerol (ホスファチジルグリセロール)
PE	Phosphatidyl Ethanolamine (ホスファチジルエタノールアミン)
PI	Phosphatidyl Inositol (ホスファチジルイノシトール)
PIV	Pixel-Intensity-Value (ピクセル強度値)
PM	Phosphatidyl Methanol (ホスファチジルメタノール)
PLA	Phospholipase A (ホスホリパーゼ A)

PLC	Phospholipase C (ホスホリパーゼ C)
PLD	Phospholipase D (ホスホリパーゼ D)
PS1P	Phytosphingosine 1-Phosphate (フィトスフィンゴシン 1-リン酸)
SphM	Sphingomyelin (スフィンゴミエリン)
S1P	Sphingosine 1-Phosphate (スフィンゴシン 1-リン酸)
THAP	2',4',6'-Trihydroxyacetophenone (2',4',6'-トリヒドロキシアセトフェノン)
TIC	Total Ion Chromatogram (トータルイオンクロマトグラム)
TLC	Thin-Layer Chromatography (薄層クロマトグラフィー)
Tween20	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (界面活性剤)
TOF	Time of Flight (飛行時間型)

脂肪酸分子種の表記は、以下のよう示した。

16:0=脂肪酸部の炭素数：脂肪酸部の二重結合数

(C₁₆) (0)

18:2=脂肪酸部の炭素数：脂肪酸部の二重結合数

(C₁₈) (2)

緒言

真核生物の生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は疎水性部分と親水性部分を併せ持つ両親媒性物質で、骨格の違いによりグリセロリン脂質とスフィンゴリン脂質に大別される。グリセロリン脂質ではグリセロール骨格の *sn*-1 位と *sn*-2 位に脂肪酸がエステル結合している。一方、スフィンゴリン脂質では長鎖スフィンゴイド塩基に脂肪酸が酸アミド結合したセラミドを疎水構造としている。動物植物を通じ、このセラミド部分にはグリセロリン脂質ではほとんどみられない炭素数 C24 (C24:0, C24:1) の極長鎖脂肪酸を結合した分子種が多く存在することが特徴である。

リン脂質は生体膜構成成分としてそのバリア機能の一端を担っているが、多様な環境変化に対応した細胞応答を誘導する生理活性脂質の前駆体としての役割も果たしている。例えば、動物細胞においてグリセロリン脂質ではプロスタグランジン等の生理活性脂質群（エイコサノイド）やリゾホスファチジン酸（LPA）などのリゾ型リン脂質メディエーターの一群はリン脂質の代謝によって生じる。具体的には、エイコサノイドはホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) の作用により切り出された *sn*-2 位のアラキドン酸 (C20:4) から派生し、炎症反応や血小板凝集に関わる。LPA はリン脂質の 2 本の脂肪酸の内、1 本を失ったリン脂質であるリゾリン脂質の一種でリゾホスファチジルコリン (LPC) の加水分解、もしくはホスファチジン酸 (PA) 選択的 PLA1 α より産生される [1, 2]。LPA はその特異的受容体を介して脳神経系形成、受精卵の着床、血管形成、リンパ管形成など様々な生理作用を発揮する [3, 4]。一方、スフィンゴリン脂質に属するメディエーター脂質ではスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) がよく知られている。S1P はスフィンゴシンがスフィンゴシンキナーゼによりリン酸化されることで産生され、その特異的受容体を介して血管新生、リンパ球動態調節、炎症そして神経機能などの生理現象に関与するとされている [5]。また医療分野においても S1P₁ の機能的アンタゴニスト FTY720 (フィンゴリモド) が免疫抑制作用をもつ多発性硬化症の治療薬として用いられている [6]。

植物においてもリン脂質は動物と同様に細胞膜の主要な成分として機能している。グリセロリン脂質ではホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルグリセロール (PG) など動物と同じタイプのリン脂質が存在する。また、植物では PA やホスファチジルイノシトール (PI) が比較的多く含まれていることが多い [7]。この内、PC はライムギ・クワ・シロイヌナズナなどにおいて低温ストレスにより増加することで凍結耐性に寄与すると考えられており、環境への適応にリン脂質の組成変化が関与している [8]。一方、植物には動物における主要スフィンゴ脂質のスフィンゴミエリン (SphM) は存在せず、多種多様な糖を結合したスフィンゴ脂質を含むことを特徴とする [9]。例えばシロイヌナズナにおいて主要なスフィンゴ脂質はグリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC)、グリコシルセラミド (GluCer)、セラミドであり、それぞれ全スフィンゴ脂質の 64%、34%、2%の割合を占めている [10]。

また、低温ストレスにおけるスフィンゴリン脂質の不飽和化 [11] やスフィンゴリン脂質代謝産物が気孔孔辺細胞の開閉の制御に関与すること [12] が報告されており、動物細胞の膜リン脂質と同様、細胞機能の制御にも関わっている。しかし、動物細胞における膜リン脂質の構造と機能に関する知見と比べると、植物組織のスフィンゴリン脂質の代謝、生理的役割について詳細な検討はほとんど行われていないのが現状である。

当研究室では、Phos-tag を用いるリン酸モノエステル型脂質のマトリックス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型マスペクトロメトリー (MALDI-TOF MS) を開発してきた [13, 14]。この方法によって動物細胞に対して生理活性を示す植物由来の食餌性脂質について解析を進め、キャベツなどアブラナ科の植物には、PA や LPA が多く含まれていることを明らかにしてきた [15, 16]。また、PA や LPA が抗潰瘍性作用をもつことを明らかにし、これらを多く含有する野菜に抗潰瘍性食品としての可能性を見出している [17, 18]。これらの一連の研究において、我々は LPA を含むことが確認されたキャベツ脂質が Swiss3T3 細胞の細胞運動性を高めることを見出した。このキャベツ脂質によって誘導された細胞応答は、キャベツ脂質中に含まれる LPA 量から予想されるよりはるかに高く、LPA 以外に活性成分が存在する可能性が示唆された。そこで、キャベツ脂質の成分について詳細に調べた結果、二次元 TLC の挙動が LPA と類似する未知リン脂質を検出した。

本研究において、私はこの未知リン脂質を C16:0, C22:0, C24:0, C24:1 の 4 種の α -ヒドロキシ脂肪酸を有するフィトセラミド 1-リン酸 (PC1P) と決定した。さらに、PC1P が GIPC 特異的なホスホリパーゼ D (GIPC-PLD) による加水分解で生じることを見出し、この酵素活性の性質、植物界における分布、組織別あるいは発育ステージ別の活性の強弱について詳細な検討を行った。PC1P が植物組織に存在すること、GIPC から PC1P を産生する新規な酵素が植物に存在することを示したのは本研究が初である。これらの結果は第一章にまとめた。

GIPC および酵素産物の PC1P は野菜に含まれている成分であり、我々は日常的に摂取している。しかしながら、その摂取量をはじめ、その消化性や吸収性など栄養学的知見は皆無である。そこで、種々の食品における GIPC と PC1P の量を調べると共に PC1P の消化性についても検討を行い、第二章にまとめた。

第一章

キャベツの葉における PC1P の同定と
GIPC 特異的 PLD の性質

序論

スフィンゴ脂質の合成はセリンとパルミトイル CoA の縮合に始まり、数段階の反応によって生成したセラミドを経て、SphM や GIPC などのスフィンゴリン脂質、グリコシルセラミドといったスフィンゴ糖脂質が合成される。動物における主なスフィンゴリン脂質は SphM であるが、植物では SphM は存在せず、GIPC が主なスフィンゴリン脂質となっている。

動物においてメディエーターとしての機能を担っているスフィンゴ脂質は植物においても同様に機能していると考えられており、例えば、動物において受容体リガンドとして細胞増殖などの細胞応答を惹起する S1P は植物においても細胞機能の調節因子であり、植物ホルモンのアブシジン酸による気孔の開閉の制御に関与する [19]。また、動物において細胞死の細胞内シグナル因子として作用するセラミドは植物でも同様に作用すると考えられており、実験植物であるシロイヌナズナにおいてセラミドキナーゼ活性の損失は、セラミドの蓄積と相関して生長期におけるプログラム細胞死を引き起こすことが示されている [20]。しかしながら、高等動物と比較すると植物スフィンゴリン脂質に関する代謝経路、細胞内含量、刺激応答時の量的変動とその生理的意義およびスフィンゴ型シグナル脂質の研究はそれほど進んでいない。これには植物スフィンゴリン脂質の中心である GIPC は水溶性が高く一般のリン脂質抽出方法では抽出が難しいことから構造や代謝に関して十分に研究されてこなかったからかもしれない。

動植物の様々な生理機能にリン脂質の加水分解が重要な役割を果たしている。植物では加水分解酵素の一つである PLD が環境ストレスや植物ホルモンに対する応答 [21]、細胞骨格の一つである微小管の再編成 [22] など様々な生理学的過程に関与するとされている。これまで植物において複数の PLD 分子種 (α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ) が同定されている [23]。しかしながら、グリセリン脂質のみであり、私の知る限りスフィンゴリン脂質を D 位置で加水分解する酵素である PLD は報告されていない。

当研究室では動物細胞に対して生理活性を示す植物由来の食餌性脂質について解析を進めてきた。その研究過程で古くから食べる胃腸薬として知られるキャベツにおいて創傷治癒ホルモンとして作用する LPA が多く含まれていることを見出した [16]。さらに、培養細胞を用いた生物検定系におけるキャベツ脂質の活性測定を行う過程で、機器分析的には約 8 nM の LPA しか含有しないキャベツ脂質が LPA 標準品 1000 nM を添加したディッシュよりも高い活性を示すなど、不可解な現象が何度も観察された。このようなキャベツ脂質の高い活性はキャベツ脂質含有の LPA のみで説明することが出来ず、キャベツ脂質の中には LPA とは異なる何らかの細胞遊走促進因子が含まれると考えるに至った。

これらのことを背景に、私が所属する研究グループでは、キャベツ脂質の成分を詳細に調べようと考え、二次元 TLC で分離される微量成分について解析を行った。その結果二次元 TLC の挙動が LPA と類似する、未知リン脂質を検出した。私は本章において、この脂質を C16:0, C22:0, C24:0, C24:1 の 4 種の α -ヒドロキシ脂肪酸を有する PC1P と決定した。更に生合成経路を調べたところ、GIPC の D 位置の加水分解によって PC1P が生じることが判明した。興味深いことにこの加水分解に関わる酵素 PLD は GIPC 特異的であり既知の PLD とは性質が異なっていた。この酵素を GIPC-PLD と命名し、植物の成長段階や様々な植物組織における酵素活性や基質 GIPC および生成物 PC1P の分布を調べることで、生理学的役割についての検討も行った。その結果、GIPC-PLD は植物の成長に関与している可能性が示された [61]。

第1節 実験方法

1-1 試薬

2',4',6'-トリヒドロキシアセトフェノン (THAP) およびキャベツ (*Brassica oleracea L. var. capitata*) 由来 PLD は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) 製を用いた。*Saccharomyces cerevisiae* 由来フィトスフィンゴシン 1-リン酸 (PS1P; *t*18:0)、大豆由来 PI、*N*-(Hexadecanoyl)-sphing-4-enine-1-phosphate (C1P; *d*18:1/16:0)、ウシ脳由来 SphM は Avanti Polar Lipids 社 (Alabaster, AL, USA) 製を用いた。S1P は Biomol 社 (Hamburg, Germany) 製を用いた。卵黄レシチンおよび大豆レシチンはそれぞれ関東化学株式会社製および和光純薬株式会社製を用いた。PC および PE は TLC を用いて卵黄レシチンから調製を行った。PI は TLC を用いて大豆レシチンから調製を行った。リン酸モノエステルに特異的に結合する亜鉛錯体 [⁶⁸Zn] を有する Phos-tag は、和光純薬工業株式会社製を用いた。マラカイトグリーン、七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 (粉末)、60% 過塩素酸、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、塩化カルシウム、28% アンモニア、塩酸 (HCl)、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、酒石酸ナトリウムカリウム四水和物、エタノールは関東化学株式会社製を用いた。Tween 20、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、プリムリンはナカライテスク製を用いた。TLC は Merck 社 (Darmstadt, Germany) 製の TLC Silica gel 60 (Glass plates, 20×20 cm) を用いた。ビスンコニン酸 (BCA) TM Protein Assay Kit は Thermo Fisher Scientific 製を用いた。有機溶媒などその他の試薬は特に断らない限り特級品を用いた。

1-2 植物材料

キャベツ (*Brassica oleracea L. var. capitata*)、ブロッコリー (*Brassica oleracea L. var. italica*)、ダイコン (*Raphanus sativus L.*)、小松菜 (*Brassica rapa L.*)、ニンジン (*Daucus carota L.*) は農家で栽培されたものを譲り受けた。キュウリ (*Cucumis sativus L.*)、ゴボウ (*Arctium lappa L.*) およびネギ (*Allium fistulosum L.*) は生鮮食料品店にて購入したものをを用いた。緑豆モヤシ (*Vigna radiate L.*) は東海工業有限会社で出荷用に栽培されたものをを用いた。種々の成長段階の緑豆モヤシはまず、緑豆モヤシ種子を水耕栽培により 23℃～28℃の暗所にて発芽させ、播種後 3 日目～4 日目で得られたモヤシを Stage 1 (出芽期) として収穫した。その後、23℃～28℃の日光下、土壌中で栽培した播種後 7 日目～14 日目のものを Stage 2、14 日目～28 日目のものを Stage 3 として収穫した。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana L.*) は Columbia 株を用い、土壌を用いて、23℃～28℃、12 時間・12 時間の明暗サイクルで栽培し、成熟植物を実験に使用した。

1-3 植物からの脂質の抽出と分析

(1) Bligh & Dyer 法による脂質抽出

対象となる植物をみじん切りにし、乳鉢で 15 分間一様にすり潰した。これを PLD などの脂質分解酵素を不活性化するために 5 分間煮沸した。各植物の水分含量を『五訂増補食品成分表 2008』を参考に計算し [24]、一層系溶媒 [クロロホルム:メタノール:水=1:2:0.8 (v/v/v)] となるように適量のクロロホルム、メタノール、水を加え、ウルトラディスパーサー (LK-21、ヤマト化学株式会社製) を用いて 5 分間ホモジナイズを行った。Bligh & Dyer 法 [25] に従い、これらのホモジネートについて遠心分離 (1,300×g、10 分間、4℃) を行い、パスツールピペットを用いて有機層を分取した。残りの水層に適量の一層系溶媒を加え同様の操作を繰り返して有機層を再度分取した。分取した有機層が二層系溶媒 [クロロホルム:メタノール:水=1:1:0.9 (v/v/v)] となるように適量のクロロホルム、水を加えた後、水層が pH2 ~ pH2.5 になるように適量の 5N HCl を加えて遠心分離 (1,300×g、10 分間、4℃) を行った。パスツールピペットを用いて有機層 (脂質画分) を分取し、残りの水層に分取した有機層と同量の [クロロホルム:メタノール=17:3 (v/v)] を加え同様の操作を繰り返して有機層 (脂質画分) を再度分取した。得られた有機層は減圧乾固し、残渣を適量の [クロロホルム:メタノール=2:1 (v/v)] の溶媒で溶解して、-20℃で保存した。

(2) PC1P の単離

1-3 (1) で得られた脂質を 0.1N KOH (95%メタノール溶液) に溶解し、15 分間、60℃で加熱することでアルカリ加水分解を行った。冷却後、酸性条件下の Bligh & Dyer 法 [25] で脂質を回収し、抽出した脂質を [クロロホルム:メタノール:28%アンモニア=60:35:6 (v/v/v)] を展開溶媒に用いる TLC で展開し、PC1P を単離した。得られた PC1P はリンモリブデンマラカイトグリーン法により比色定量した [26]。

(3) GIPC の単離

GIPC は水溶性であり、一般的なリン脂質の抽出方法である Bligh & Dyer 法 [25] では抽出効率が低い。そこで Markham らの報告した [2-プロパノール:ヘキサン:水=55:20:25 (v/v/v)] の下層 (solvent A) を用いる抽出法 [10] を改良した方法 [27] を用いて GIPC を抽出した。まず、植物組織の破碎に伴って活性化する PLD などの脂質分解酵素を不活性化するために 5 分間材料を煮沸した。その後、材料と等量の solvent A を加えてウルトラディスパーサー (LK-21、ヤマト化学株式会社製) を用いて 5 分間ホモジナイズを行った。得られたホモジネートを 15 分間、60℃で加熱した後、遠心分離 (1,300×g、10 分間、4℃) を行い、パスツールピペットを用いて上清を分取した。回収した上清と同量の solvent A を残渣に加え、同様の操作を繰り返して上清を再度分取した。得られた上清を減圧留去し、残渣に適量の [40%メチルアミン:エタノール=1:1 (v/v)] を加え、1 時間、50℃で加熱することでアルカリ加水分解を行った。溶媒を減圧留去した後、[クロロホルム:メタノール:7.9%

アンモニア=45:35:10 (v/v/v)] を展開溶媒に用いる TLC に供し、GIPC を単離した。得られた GIPC はリンモリブデンマラカイトグリーン法により比色定量した [26]。また精製した GIPC は、MALDI-TOF MS による解析で構造を確認した。

(4) 二次元 TLC による脂質の分析

二次元 TLC は縦および横方向で二度展開することにより一次元 TLC では分離しがたい複雑な混合試料を高度に分離することが出来る。今回キャベツ (*Brassica oleracea L. var. capitata*) 脂質を詳細に調べるために二次元 TLC を用いて分析を行った。1-3 (1) で調製した脂質画分におけるリン脂質含量を次の 1-4 で示す方法により定量した後、リン脂質量として 323 nmol となるように分取し、予め 1 時間、100°C の加熱で活性化させておいた TLC プレートに下端、左端よりそれぞれ 1.5 cm の所にアプライした。予め飽和させておいた一次元溶媒 [クロロホルム:メタノール:28%アンモニア=60:35:8 (v/v/v)] でプレートの上端近くになるまで展開させた。展開槽から取り出した TLC プレートを完全に乾燥させた後、90 度回転させ、一次元で展開した端が下端となるようにして、二次元溶媒 [クロロホルム:アセトン:メタノール:酢酸:水=50:20:10:13:5 (v/v/v/v/v)] を予め飽和させておいた展開槽で再展開した。ドラフト内で完全に溶媒を蒸発留去した後、プリムリン試薬を噴霧し、UV 照射 (365 nm) 下で発色を示す脂質を確認した。また、リン酸基と反応し青く呈色する Dittmer-Lester 試薬およびアミノ基と反応し赤く呈色する Ninhydrin 試薬も噴霧し、各リン脂質の分析を行った。

1-4 リン脂質濃度の測定

Chalvardjian と Rudnicki の方法 [26] に従い有機リン含量を測定した。リン脂質を含む試料液の一定量を試験管に分取し、窒素気流によって溶媒を蒸発留去した。これに、60% 過塩素酸 0.1 ml および蒸留水 0.1 ml を加え、90 分間、150°C ~ 160°C で加熱した。室温まで冷却した後、蒸留水 1 ml、4.2% モリブデン酸アンモニウム・マラカイトグリーン試薬 5 ml および 1.5% Tween20 溶液 0.2 ml を加え、よく混合した後、島津 UV-1600 分光光度計で 660 nm の吸光度を比色定量した。

1-5 Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS

Morishige らの方法に従い、リン脂質を分析した [13, 14]。まず、リン脂質の適量を少量の 0.1% アンモニア性メタノールで溶解した。この溶液 10 μ l を 5 μ l の 0.1 mM [⁶⁸Zn] Phos-tag 溶液および 2 μ l のシリカ懸濁液 (100 mg/ml: 溶媒メタノール) と混合し攪拌することでリン脂質・Phos-tag 複合体を得た。次に、この混合溶液の 0.5 μ l をサンプルプレートにスポットした。その上からマトリックスとして 0.5 μ l の 2,4-dihydrobenzoic acid をスポットし結晶化させた。マトリックス/分析物共結晶を Voyager DE STR 質量分析計 (Applied Biosystems 社 (Framingham, MA, USA) 製) を用いて陽イオン検出モードで検出した。

GIPC は陰イオン検出モードで検出した。この場合、マトリックスとしては Phos-tag を使用せず、2,4-dihydrobenzoic acid を使用した。窒素発光レーザーの波長は 337 nm、イオンチャンバ内の圧力は 3.7×10^{-7} Torr、加速電圧は 20 kV とした。また再現性を向上させるために、256 回のレーザーショットで得られる各マスペクトルを平均した。

1-6 GC-MS

単離した PC1P (11 mol) を 1 ml の 14%三フッ化ホウ素含有メタノールで溶解し、90 分間、100°Cで加熱した。室温まで冷却してから、水 1 ml とペンタン 2 ml を加え、よく攪拌した後、遠心分離 (1,100×g、5 分間、4°C) を行い、上層の有機層を分取した。得られた脂肪酸メチルエステルをオートマス質量分析計 (JEOL 社製) とガスクロマトグラフ (GC5890、Hewlett Packard 社 (Wilmington, DE, USA) 製) を用いた GC-MS によって分析した。GC に使用したキャピラリーカラムは、非極性 DB-1 カラム (長さ 30 m・内径 0.25 mm、フィルム厚さ直径 0.25 μm、J & W Scientific 社 (Folsom, CA, USA) 製) を使用した。カラム温度は 100°C ~ 300°Cまで、1 分当たり 20°Cで増加させ、この温度を保った。キャリアガスはヘリウムを用いた。イオン化エネルギーは 70 eV で行った。

1-7 PC1P の化学処理

1 nmol の PC1P を 0.15 ml の [無水酢酸:ピリジン=2:1 (v/v)] に溶解し、3 時間、37°Cでインキュベートすることでアセチル化反応を行った。また、PC1P のアセチル化を遊離アミノ基のみ行う場合はこの溶媒にメタノール 0.5 ml を加えた。インキュベーション後、得られたアセチル化 PC1P を MALDI-TOF MS で分析した。48.4 nmol (1.5 μgP) の PC1P を 0.3 ml の含水アセトニトリル性塩酸 [濃塩酸: 水:アセトニトリル=0.45:0.72:8.83 (v/v/v)] に溶解し、overnight、75°Cで加熱することで PC1P の脱アシル化反応を行った。窒素気流によって溶媒を蒸発留去した後、塩基性条件下の Bligh & Dyer 法 [25] で脂質を回収し、抽出した脂質を [クロロホルム:メタノール:28%アンモニア=45:50:8 (v/v/v)] を展開溶媒に用いる TLC で単離した。この時得た PC1P の脱アシル誘導体を MALDI-TOF MS または高分解能質量分析法で分析した。PC1P の脱アシル誘導体の平均収率は約 30%であった。

1-8 高分解能質量分析

PC1P およびその脱アシル化体についてエレクトロスプレーイオン化・TOF MS (ESI-TOF MS) を用いて高分解能質量分析を行った。ESI-TOF MS の装置は LCT プレミア質量分析計 (Micromass/Waters 社 (Milford, MA, USA) 製) であり、陰イオン検出モードで検出した。精製したサンプルをメタノール中で直接注入して ESI ポートに導入した。ディゾルベーション温度は 150°C、ソース温度は 100°Cとし、ディゾルベーションガス流量は 300 L/h とした。エレクトロスプレーとサンプルコーンのそれぞれのキャピラリー電圧

はそれぞれ 3000 V、75 V に設定した。器具は MASSLYNX 4.0 ソフトウェア (Waters 社 (Milford, MA, USA) 製) で設定されたものを用いた。スペクトルは 10 回以上スキャンを行い、その平均値を採用した。

1-9 キャベツ葉ホモジネート中の PC1P の生成

室温下でキャベツ葉をホモジネートすると直後に PC1P が生成される。そこで -80℃ で冷凍したキャベツ葉を用いて PC1P 生成の経時変化を調べた。まず、凍結したキャベツ葉 (10 g) を細かく砕いた後、冷やした乳鉢と乳棒を用いてホモジナイズした。このホモジネートを所定の時間、30℃ でインキュベートした。電子レンジ処理による加熱により反応を停止させた。各インキュベート時間で得られたキャベツ脂質抽出物の内、PC1P と GIPC について前述の方法で定量を行った。

1-10 植物組織の亜細胞分画

凍結した植物組織を粉砕し、等量の氷冷した緩衝液 (0.05 M Tris/HCl, pH7.4) に添加し、ウルトラディスパーサー (LK-21、ヤマト化学株式会社製) を用いて 5 分間ホモジナイズした。次に、ホモジネートをガーゼで濾過し、5,000×g で 15 分間、13,000×g で 30 分間、100,000×g で 60 分間、4℃ で順次遠心分離を行った。沈殿画分を氷冷緩衝液に懸濁し、各画分の一部を後述の GIPC-PLD アッセイに使用した。タンパク質含量は、BCA タンパク質アッセイ [28] によって決定した。この実験方法の概略を以下に示す。検量線としてアルブミン標準液 (0.2 g/ml)、0, 20, 30, 35, 40 μl をマイクロチューブに分取した。被験液として、各酵素から適量をマイクロチューブに分取し、標準液・被験液いずれも全量 40 μl となるように水を加えた。次に、A 液 [Na₂CO₃, 重 Na₂CO₃, BCA 検出試薬, 酒石酸 Na 含有 0.1 M NaOH] と B 液 [4% CuSO₄ (5H₂O)] を 50:1 となるようにそれぞれ適量混合し、反応試薬を調製した。この反応試薬をそれぞれマイクロチューブに 400 μl 加え、攪拌し、室温で 2 時間静置した。2 時間後、吸収波長 562 nm での吸光度を測定し、アルブミン標準液による検量線から、試料中のタンパク質量を求めた。

1-11 粗精製 PC-PLD および GIPC-PLD の画分の調製

粗精製 PC-PLD 画分は、Davidson らの方法 [29] に従い、キャベツ葉から調製した。まず、キャベツの葉に等量の生理食塩水を加えてウルトラディスパーサー (LK-21、ヤマト化学株式会社製) を用いてホモジナイズを行った。このホモジネートを 5 分間、55℃ で加熱した後、遠心分離 (11,000×g、30 分間、4℃) を行い、パスツールピペットを用いて上清を分取した。回収した上清の 2 倍量のアセトンを加え、20℃ で冷却することで冷アセトン沈殿物が得られた。これを粗精製 PC-PLD 画分として使用した。GIPC-PLD 画分はキャベツホモジネートの 100,000×g (100k) 沈殿画分から調製した。0.6% Triton を含む 0.2 M Tris/HCl 緩衝液 (pH7.4) で 100 k 沈殿画分を溶かした後、遠心分離 (10,000×g、30 分間、

4℃)を行った。この時の上清画分中のタンパク質を飽和硫酸 (60%飽和) で沈殿させた。この沈渣を透析し、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーに掛け、200 mM の NaCl で再溶解して得られた活性画分を後述の GIPC-PLD アッセイに用いた。

1-12 PC-PLD アッセイと GIPC-PLD アッセイ

PC-PLD アッセイは 48 nmol の卵黄 PC に 0.15 ml の酵素画分、0.1 ml の塩化カルシウムおよび 1 ml のジエチルエーテル加えて、最後に 0.1 M の酢酸緩衝液 (pH5.6) で総量 1.7 ml にして行った。市販のキャベツ PLD (Sigma-Aldrich) または前述の方法で調製したキャベツ PC-PLD を用いてアッセイを行った。GIPC-PLD アッセイはキャベツから精製した 48 nmol の GIPC に 0.02 ml ~ 0.1 ml の酵素画分、3 mg のデオキシコール酸ナトリウムを加えて、最後に 0.2 mM の Tris/HCl 緩衝液 (pH7.4) で総量 0.7 ml にして行った。この反応混合物を 30℃で連続攪拌しながらインキュベートした。5 分間または 30 分間インキュベートした後、酸性条件下の Bligh & Dyer 法 [25] を用いて反応混合物中の脂質を抽出した。得られた PC1P は TLC により単離し、リンモリブデンマラカイトグリーン法により比色定量した [26]。また、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.5 ~ pH5.6)、0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.5)、0.1 M Tris/HCl 緩衝液 (pH6.8 ~ pH8.5) を使用して様々な pH でアッセイを行った。

1-13 統計分析

スチューデント *t* 検定を用いて 2 つの差の有意差の統計解析を行った。 $P < 0.05$ で統計学的に有意であるとみなした。

第2節 実験結果

2-1 キャベツ脂質由来の未知リン脂質 X の構造解析

(1) 二次元 TLC によるリン脂質 X の検出

キャベツ脂質抽出物に含まれる各成分を二次元 TLC にて分離を行った (Fig. 1)。その結果、既知のリン脂質の PC、PE、PA、PI 及びメタノール存在下の PLD 反応副産物として生じるホスファチジルメタノール (PM) の他に、LPA の近くに帰属出来ない未知リン脂質を検出した。以後、このリン脂質を「リン脂質 X」と仮称して記述する。まず、リン脂質 X の発色試薬への反応を調べた。その結果、リン脂質 X はリン酸基と反応し、青色を呈する Dittmer-Lester 試薬陽性であったが、アミノ基と反応し、赤色を呈する Ninhydrin 試薬陰性であることから、遊離アミノ基を持たないリン脂質であると考えられた。

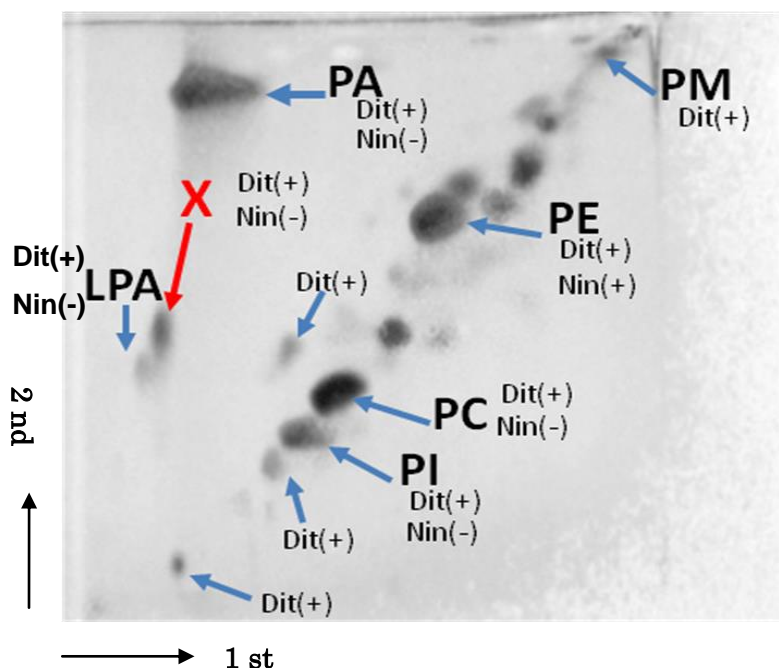


Fig. 1 二次元 TLC によるキャベツ脂質の分析

キャベツ脂質を二次元 TLC によって分離した。溶媒は一次元目 (右方向に展開) が塩基性 [クロロホルム:メタノール:28%アンモニア=60:35:8 (v/v/v)]、二次元目 (上方向に展開) が酸性系 [クロロホルム:アセトン:メタノール:酢酸:水=50:20:10:13:5 (v/v/v/v/v)] を用いた。プリムリン試薬を噴霧し、UV 光下で可視化した。Dit 及び Nin は、それぞれ Dittmer-Lester 試薬及び Ninhydrin 試薬との反応性を示す。LPA とよく似た挙動を示す帰属出来ない未知リン脂質を X で示した。

PA, ホスファチジン酸; PC, ホスファチジルコリン; PE, ホスファチジルエタノールアミン; PI, ホスファチジルイノシトール; LPA, リゾホスファチジン酸; PM, ホスファチジルメタノール

(2) アルカリ耐性試験

TLC を用いて単離したリン脂質 X を 0.1N KOH/95% MeOH に溶解し、15 分間、60℃で処理することで、リン脂質 X のアルカリ耐性試験を行った (Fig. 2)。同一条件で行ったグリセロ型リン脂質である LPA はこの処理により分解されて消失した。一方、スフィンゴ型リン脂質である SphM はアルカリに対して耐性であった。この時、リン脂質 X は SphM と同様にアルカリに対して耐性であることが分かった。また、リン脂質 X の下に見られる薄いバンドは LPA のコンタミネーションであると考えられるが、アルカリ処理により分解されて消失した。この結果より、リン脂質 X はグリセロ型ではなくスフィンゴ型リン脂質であると考えられた。



Fig. 2 アルカリ耐性試験

リン脂質 X に対して、0.1N KOH/95% MeOH (15 分間、60℃) のアルカリ処理を行い、塩基性系展開溶媒 [クロロホルム:メタノール:28%アンモニア=60:35:8 (v/v/v)] で展開した。アルカリ処理を行ったリン脂質を alkali、アルカリ処理を行っていないリン脂質を non で表す。また、グリセロ型リン脂質として LPA、スフィンゴ型リン脂質として SphM を用い、本条件におけるアルカリ感受性を確認した。

(3) Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS 解析

我々はリン酸モノエステル残基に特異的に結合する亜鉛錯体の Phos-tag を利用したリン酸モノエステル型脂質の MALDI-TOF MS 解析を開発している [13, 14]。この解析を単離したリン脂質 X について行った。その結果、 m/z 1200 ~ m/z 1550 の範囲において、Phos-tag 試薬非存在下ではピークは観察されないが、Phos-tag 試薬存在下では m/z 1236.5, m/z 1320.6, m/z 1346.7, m/z 1348.7 にピークが観察された (Fig. 3A, B)。これはリン脂質 X がリン酸モノエステル残基を含有するリン脂質であることと、複数のホモログで構成されていることを意味した。次に、リン脂質 X のアセチル化を行い、前後のマススペクトルを比較した。遊離アミノ基並びに水酸基をアセチル化する条件ではリン脂質 X ホモログの各イオンにおいて、126 マスユニットのマスシフトが観察された (Fig. 3D)。しかし、遊離アミノ基のみをアセチル化する条件では、マスシフトは観察されなかった (Fig. 3C)。以上の結果より、リン脂質 X が分子内に遊離アミノ基を持たないこと、3 個の水酸基を持つことが分かった。

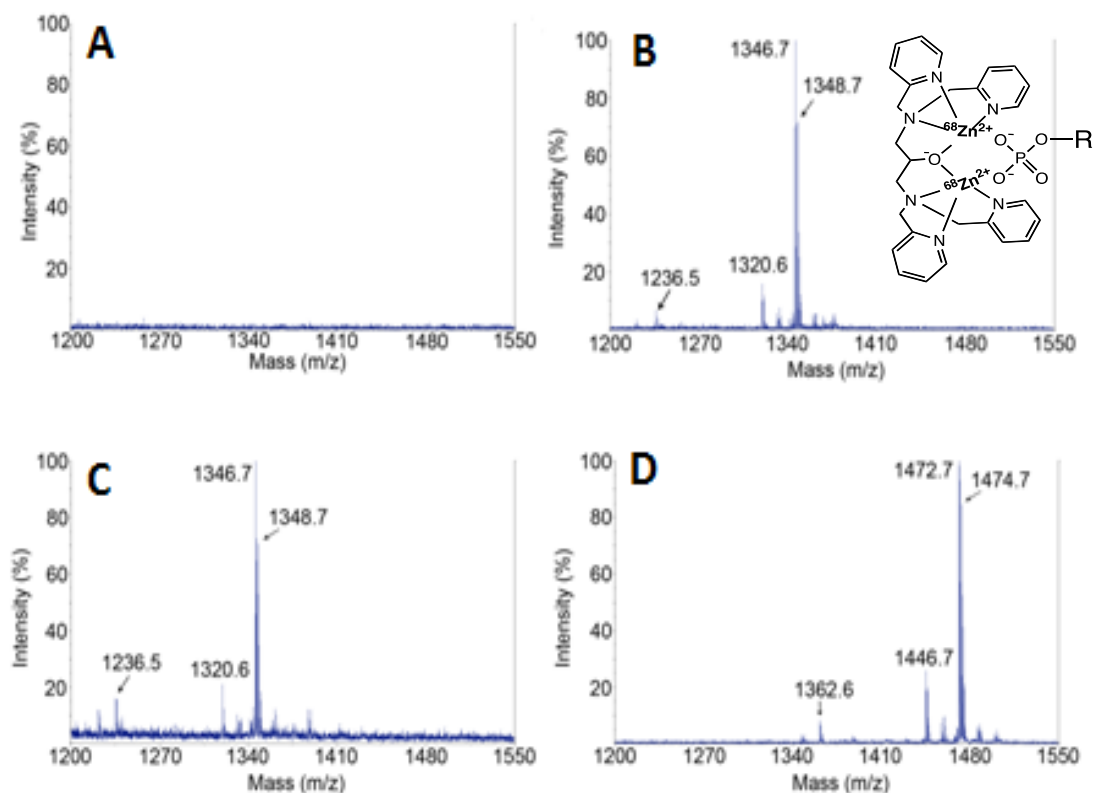


Fig. 3 Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS 解析

単離したリン脂質 X について (A) Phos-tag 非存在下 (B) Phos-tag 存在下で MALDI-TOF MS を行った。リン脂質 X の (C) N-アセチル化、(D) N, O-アセチル化をそれぞれ行い、Phos-tag 存在下で MALDI-TOF MS で分析を行った。

※ (B) の挿入図に示す化学構造は、Phos-tag とそのゲスト化合物である。

すなわち、リン脂質 X は極性頭部にリン酸モノエステルを配したスフィンゴリン脂質で、遊離アミノ基はなく、3 個の水酸基を有する。これらの特徴とリン脂質 X の分子量から、リン脂質 X の推定構造として、鎖長の異なる 4 種の α -ヒドロキシ脂肪酸を有するフィト型セラミド 1-リン酸を想定した。

(4) GC-MS によるリン脂質 X の *N*-アシル鎖の解析

リン脂質 X の *N*-アシル鎖を解析するために脂肪酸メチルエステルを調製し、GC-MS を行った。その結果、トータルイオンクロマトグラム (TIC) 上、8 分 ~ 13 分の間に 4 つのピークが検出された (Fig. 4A)。それぞれのピークのトップで得られたマスペクトルには m/z 227, m/z 311, m/z 337, m/z 339 に高い強度のイオンピークが検出された (Fig. 4B)。ここで α -ヒドロキシ脂肪酸は電子衝撃イオン化法によりイオン化される

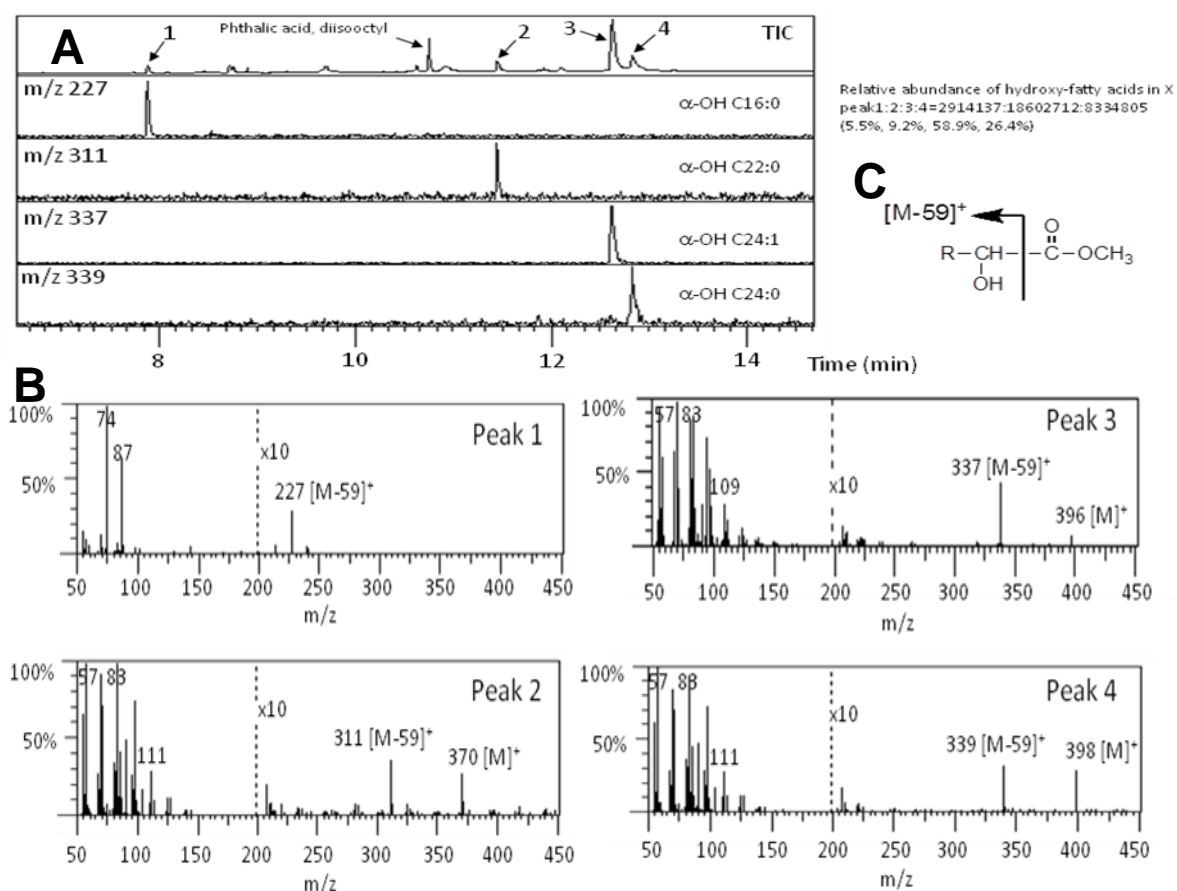


Fig. 4 GC-MS によるリン脂質 X の *N*-アシル鎖の解析

リン脂質 X より得た脂肪酸メチルエステルを GC-MS で分析した。(A) TIC 及び選択イオンクロマトグラフィー (m/z 227, m/z 311, m/z 337, m/z 339)。ピーク 1 と 2 の間に検出された顕著なピークはフタル酸ジイソオクチルエステルによる汚染によるものであった。(B) TIC 上で検出されたピーク 1 ~ 4 のトップで得られたマスペクトル (C) α -ヒドロキシ脂肪酸のメチルエステルで特徴的に見られるフラグメントパターン

際、 α -ヒドロキシ基とカルボニル炭素の間で開裂したフラグメントイオン $[M-59]^+$ が高い強度で検出されることが報告されている (Fig. 4C) [30]。 m/z 227, m/z 311, m/z 337, m/z 339 がこの様式で生じるフラグメントイオンの $[M-59]^+$ と考えると、ピーク 1, 2, 3, 4 はそれぞれ C16:0, C22:0, C24:0, C24:1 の 4 種の α -ヒドロキシ脂肪酸と帰属可能であった。また、総イオンクロマトグラフィーにおけるピーク 1~4 のピーク面積比はピーク 1:2:3:4=5.5%:9.2%:58.9%:26.4% の比率であった。この比率は Fig. 3B で示した MALDI-TOF 質量スペクトルで検出された 4 つの主要なイオン (m/z 1236.5, m/z 1320.6, m/z 1346.7, m/z 1348.7) のピーク高さの相対強度と一致している。これらの結果より、リン脂質 X は *N*-アシル鎖として C16:0, C22:0, C24:0, C24:1 の 4 種の α -ヒドロキシ脂肪酸のいずれかを有するホモログであると考えられた。

(5) リン脂質 X のスフィンゴシン骨格の解析

リン脂質 X の骨格を解析するために、含水アセトニトリル性塩酸処理 (overnight, 75°C) を行うことで、リン脂質 X の脱 *N*-アシル化体を調製した。この脱 *N*-アシル化体を展開溶媒として [クロロホルム:メタノール:28%アンモニア=45:50:8 (v/v/v)] を用いる TLC で展開したところ、*R_f* 値 (0.06) 付近にスポットが見られ、これは標準品のフィトスフィンゴシン 1-リン酸と一致した (データ未掲載)。

次に、リン脂質 X の脱 *N*-アシル化体に対して、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS 解析を行ったところ、Phos-tag 試薬存在下で m/z 982.3 に単一ピークが観察された (Fig. 5A)。更に、アセチル化操作を行い、その前後のマススペクトルを比較した。その結果、遊離アミノ基のみをアセチル化する条件では 42 マスユニットのシフトが観察され、遊離アミノ基並びに水酸基を共にアセチル化する条件では 126 マスユニットのシフトが観察された (Fig. 5B, C)。これらの結果は、リン脂質 X の *N*-脱アシル化体がリン酸モノエステル残基を含有するリン脂質であることと、分子内に 1 個の遊離アミノ基と 2 個の水酸基を持つことを示唆した。標準品のフィトスフィンゴシン 1-リン酸に対して、同じく Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS 解析を行ったところ、 m/z 982.3 に単一ピークが観察され、各アセチル化処理前後のマススペクトル上で観察されるマスシフトは前述の結果と一致した (データ未掲載)。また、精密質量解析のための TOF MS (陰イオン検出モード) を行ったところ、検出されたリン脂質 X の脱 *N*-アシル化体のピークは m/z 394.2355 であった (Fig. 6)。この値は、予想したフィトスフィンゴシン 1-リン酸の原子組成 (C₁₈H₃₇NO₆P) の理論質量 m/z 394.2353 とほぼ一致した (差は 0.2 mDa)。以上の結果より、リン脂質 X の脱 *N*-アシル化体はフィトスフィンゴシン 1-リン酸と確認出来、これがリン脂質 X の骨格であると決定された。

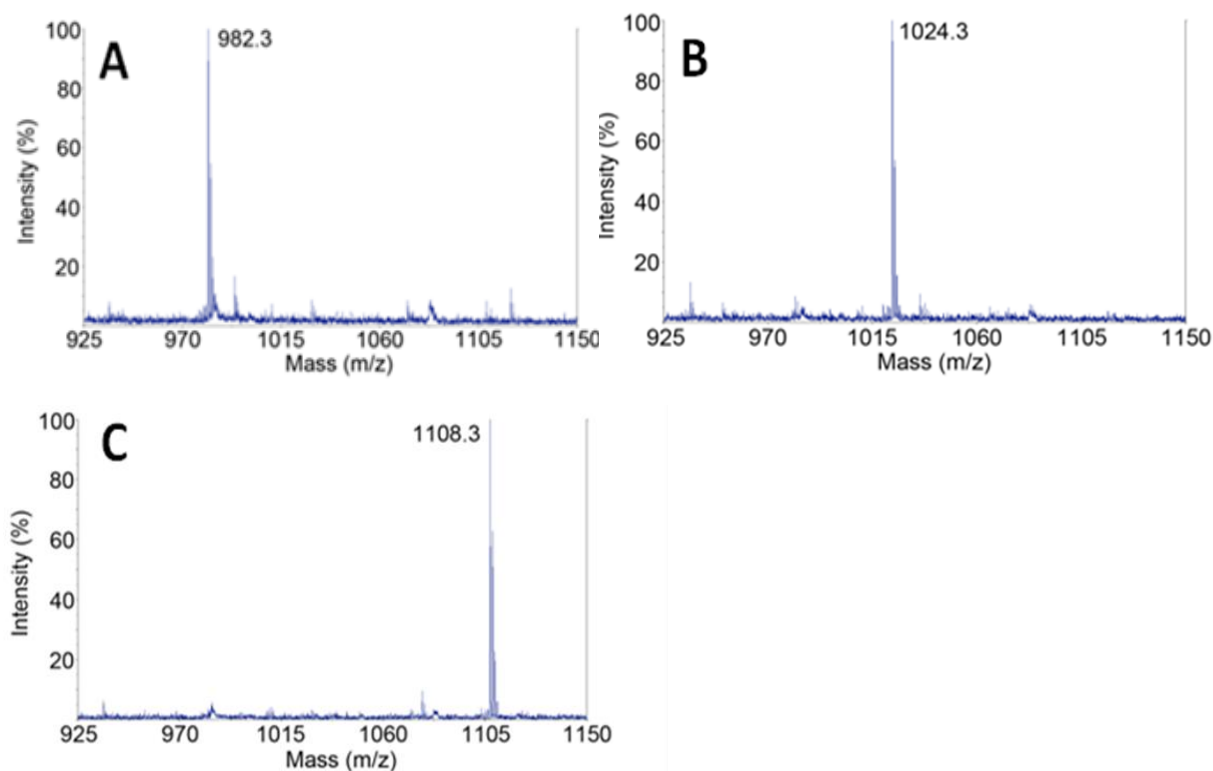


Fig. 5 リン脂質 X のスフィンゴシン骨格の解析 (Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS 解析)

リン脂質 X の含水アセトニトリル性塩酸処理を行い、脱 *N*-アシル化体を調製した。調製したリン脂質 X の脱 *N*-アシル化体について Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS で分析を行った。次に (B) *N*-アセチル化、(C) *N*, *O*-アセチル化をそれぞれ行い、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS で分析を行った。

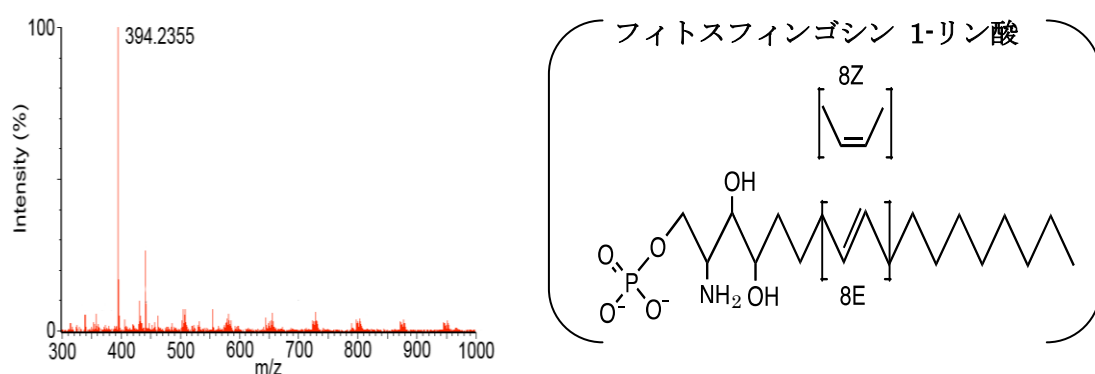


Fig. 6 リン脂質 X のスフィンゴシン骨格の TOF MS による質量分析

リン脂質 X の含水アセトニトリル性塩酸処理を行い、脱 *N*-アシル化体を調製した。調製したリン脂質 X の *N*-脱アシル化体の TOF MS (陰イオン検出モード) による精密質量解析を行った。

※挿入図に示す化学構造は、フィトスフィンゴシン 1-リン酸である。

(1) ~ (5) の結果は、キャベツ葉中に見出された未知リン脂質 X が C16:0, C22:0, C24:0, C24:1 の 4 種の α -ヒドロキシ脂肪酸を有する Phytoceramide 1-phosphate (PC1P) であることを示した (Fig. 7)。以上の解析の結果のみからでは 4-ヒドロキシスフィンゲニンの二重結合の位置や立体配置、もしくは PC1P の *N*-アシル鎖の C24:1 の二重結合の位置は不明である。しかし、トマトやシロイヌナズナにおいて 4-ヒドロキシスフィンゲニンの二重結合は C-8, 9 位間にあり、*cis*, *trans* 両方の立体配置を取ること [4]、シロイヌナズナにおいて *N*-アシル鎖の C24:1 の二重結合は C-15, 16 位間を取ること [30] が報告されている。従って、PC1P の長鎖塩基の二重結合は C-8, 9 位間、C24:1 の二重結合は C-15, 16 位間の可能性が高いものと考えられる。

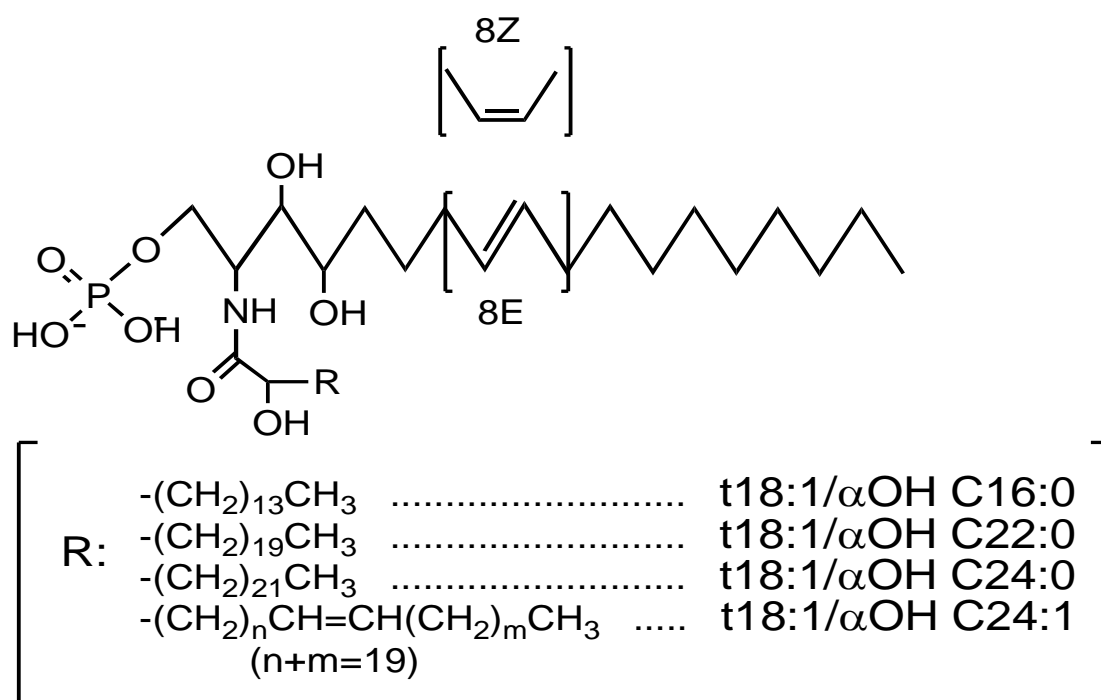


Fig. 7 Phytoceramide 1-phosphate (PC1P) の構造

Structure of phytoceramide-1-phosphate in cabbage leaf

(6) TOF MS による精密質量分析

PC1P について TOF MS を用いて精密質量分析を行ったところ、4 つのピークが検出された。それぞれの実測精密質量は m/z 648.4657 (X1), m/z 732.5519 (X2), m/z 758.5657 (X3), m/z 760.5782 (X4) であった (Fig. 8)。これらを C16:0, C22:0, C24:0, C24:1 の α -ヒドロキシ脂肪酸を有する PC1P として考えた場合、その原子組成から計算される理論値と実測値の差はいずれも 5 mDa 以下であった (Table 1)。従って、ピーク X1 ~ X4 はそれぞれ X1: PC1P [t18:1/C16:0h], X2: PC1P [t18:1/C22:0h], X3: PC1P [t18:1/C24:0h], X4: PC1P [t18:1/C24:1h] と帰属出来、これらは Fig. 7 の結果を裏付けるものであった。

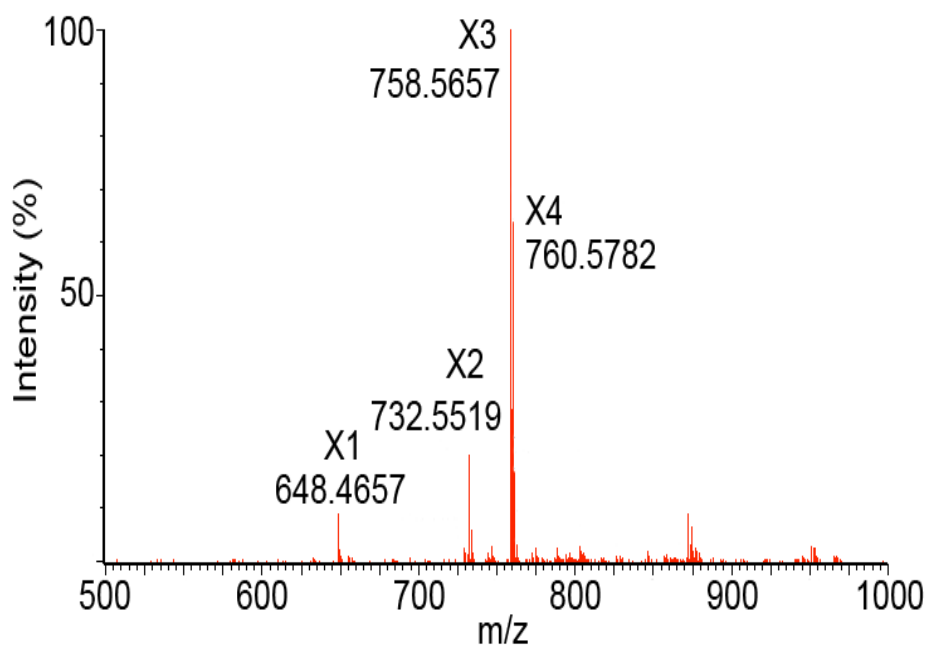


Fig. 8 PC1P の TOF MS による質量分析

PC1P を TOF MS (陽イオン検出モード) で分析を行った。

Table 1

Fig. 8 で検出されたそれぞれのイオンピーク (X1 ~ X4) の実測値と推定構造の理論値

	実測値	組成と理論値	PC1P (分子種)
X1	648.4657	648.4604 (C ₃₄ H ₆₇ NO ₈ P)	<i>l</i> 18:1/C16:0h
X2	732.5519	732.5543 (C ₄₀ H ₇₉ NO ₈ P)	<i>l</i> 18:1/C22:0h
X3	758.5657	758.5700 (C ₄₂ H ₈₁ NO ₈ P)	<i>l</i> 18:1/C24:0h
X4	760.5782	760.5782 (C ₄₂ H ₈₃ NO ₈ P)	<i>l</i> 18:1/C24:1h

2-2 PC1P の生合成経路

(1) 想定される PC1P 経路

PC1P の生合成経路として、1) セラミドのリン酸化、2) GIPC の加水分解の 2 つの経路が想定される (Fig. 9)。1) は動物や植物で示されているセラミドキナーゼ経路であり、ATP 由来のリン酸が転移する。2) は GIPC のリン酸とイノシトールの間で加水分解される経路であり、PLD 反応である。

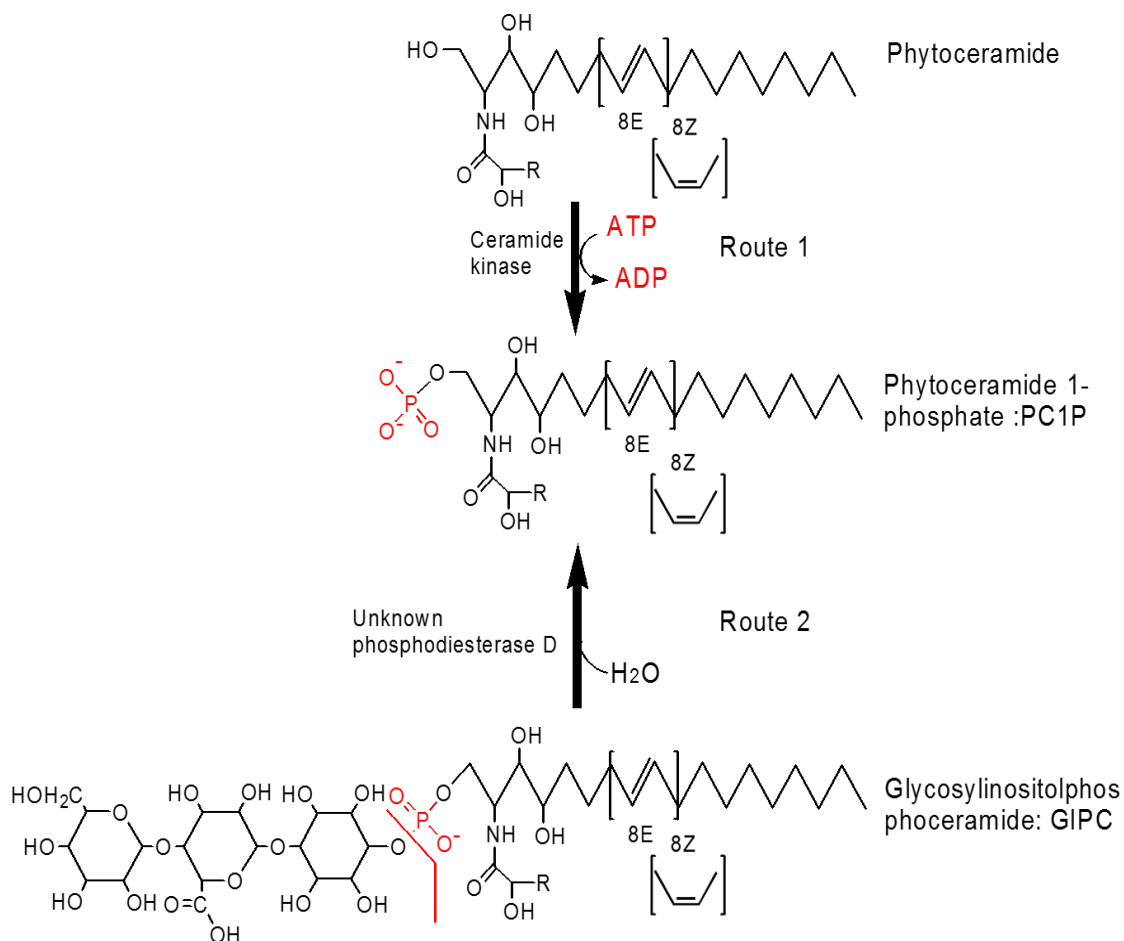


Fig. 9 PC1P の生合成経路の候補

PC1P の生合成経路として、Route 1:セラミドのリン酸化、Route 2: GIPC の加水分解を想定した。

(2) LC-MS/MS による GIPC, セラミド, PC1P の分子種分析

PC1P の生合成の前駆体として想定した GIPC 及びセラミドを第二章で述べる方法を用いて単離し、これらと PC1P について LC-MS/MS による分子種分析を行い、その組成の相違について調べた。キャベツより、PC1P、GIPC 及びセラミドを単離し、LC-MS/MS による分子種組成分析を行った結果、セラミドに検出されるジオール型分子種が PC1P と GIPC で検出されず、また、セラミドでは構成比率が低い分子種 [t18:1/C24:0h-OH] が PC1P と GIPC では共に高い構成比率で検出された(Fig. 10, Table 2)。これらの結果より、PC1P の分子種組成は、セラミドよりも GIPC と類似性が高いことが分かった。

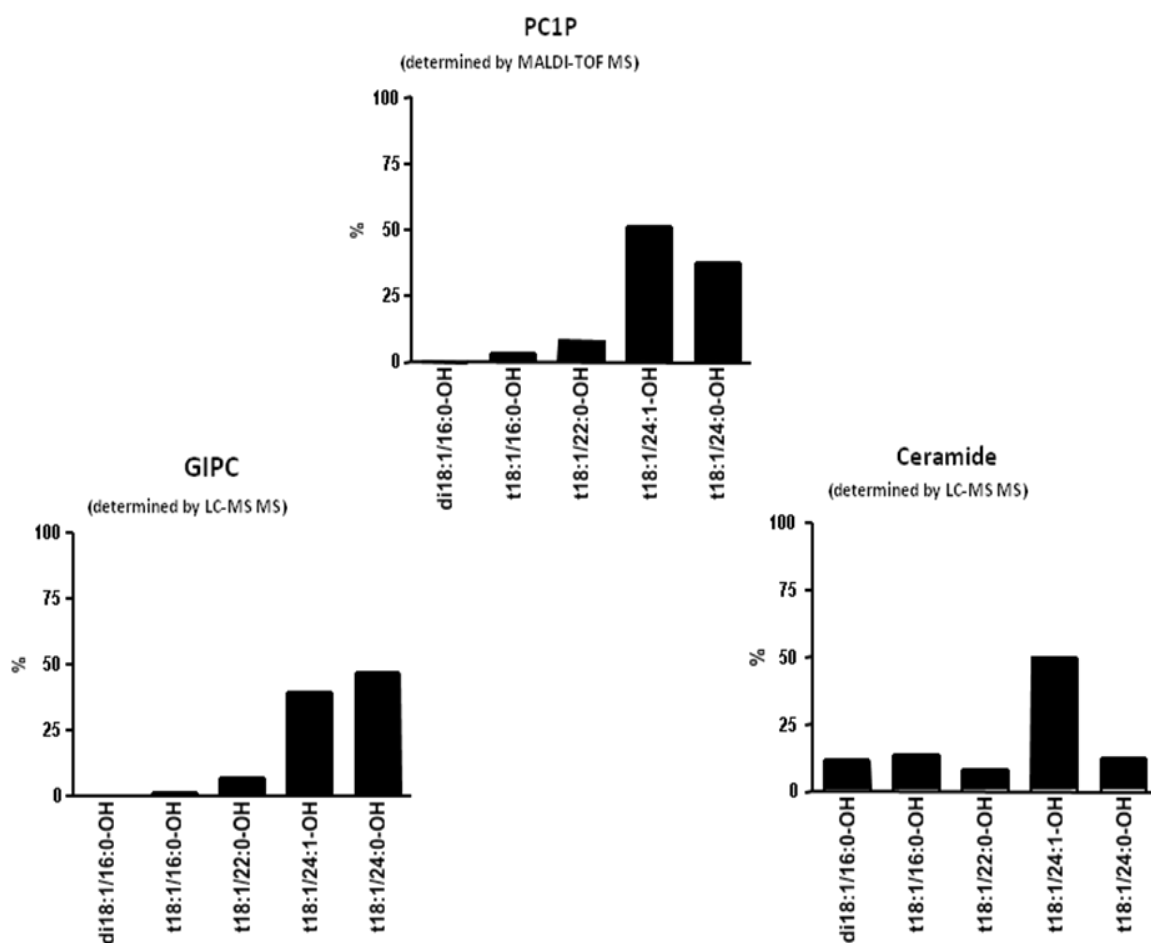


Fig. 10 LC-MS/MS による GIPC, セラミド, PC1P の分子種分析

Table 2 LC-MS/MSによる GIPC, セラミドの分子種分析

GIPC, セラミドはそれぞれキャベツより得た。フィットセラミドは $[M+H]^+$ と $[M-(N\text{-acyl})-3H_2O]^+$ のイオン、セラミドは $[M+H]^+$ と $[M-(N\text{-acyl})-2H_2O]^+$ のイオンをそれぞれ用いて各分子種を検出した。GIPC は $[M+Na]^+$ とフラグメントイオン $[\text{hexose-hexuronic acid-inositol-}P_3H_2+Na]^+$ (m/z 621.1) を用いて検出した。セラミド及び GIPC の分子種組成はピーク面積に基づいて決定した。N.D. : 検出限界以下を示す。データは単一の実験で決定した。

Molecular species	Ceramide	GIPC
	relative abundance (%)	
d18:0/16:0h	0.1	N.D.
d18:0/22:0h	N.D.	N.D.
d18:0/24:0h	N.D.	3.8
d18:0/24:1h	N.D.	1.2
d18:0/26:0h	N.D.	0.9
d18:0/26:1h	N.D.	1.0
d18:1/16:0h	11.5	N.D.
d18:1/22:0h	N.D.	N.D.
d18:1/24:0h	0.7	N.D.
d18:1/24:1h	Trace	Trace
d18:1/26:0h	0.2	N.D.
d18:1/26:1h	Trace	N.D.
t18:0/16:0h	N.D.	N.D.
t18:0/22:0h	Trace	0.2
t18:0/24:0h	Trace	1.2
t18:0/24:1h	0.3	2.3
t18:0/26:0h	N.D.	N.D.
t18:0/26:1h	Trace	N.D.
t18:1/16:0h	13.3	1.3
t18:1/22:0h	8.0	6.3
t18:1/24:0h	12.2	42.1
t18:1/24:1h	48.2	35.5
t18:1/26:0h	0.9	4.0
t18:1/26:1h	3.2	0.1

(3) キャベツホモジネートにおける GIPC からの PC1P 生成

キャベツは豊富な PLD 活性を有することが知られている [29]。生のキャベツ葉をホモジナイズすると、その PLD 活性により内因性リン脂質が PA に変換される [31]。一方、ホモジナイズ前にキャベツ葉を煮沸処理すると、PLD 活性が不活性化されるために PA への変換効率が落ちる。実際、Fig. 11A に示すように、生のキャベツ由来抽出物ではより多くの内因性リン脂質が PA に変換されていることが TLC のスポットの大きさから確認出来る。PC1P においても同様の変化が起きており、生のキャベツ由来の PC1P のスポットは煮沸したキャベツ由来の PC1P のものより濃くなっていた (Fig. 11A)。この時、GIPC は PC1P と逆の増減パターンを示し (Fig. 11B)、その増減幅も同等であることが

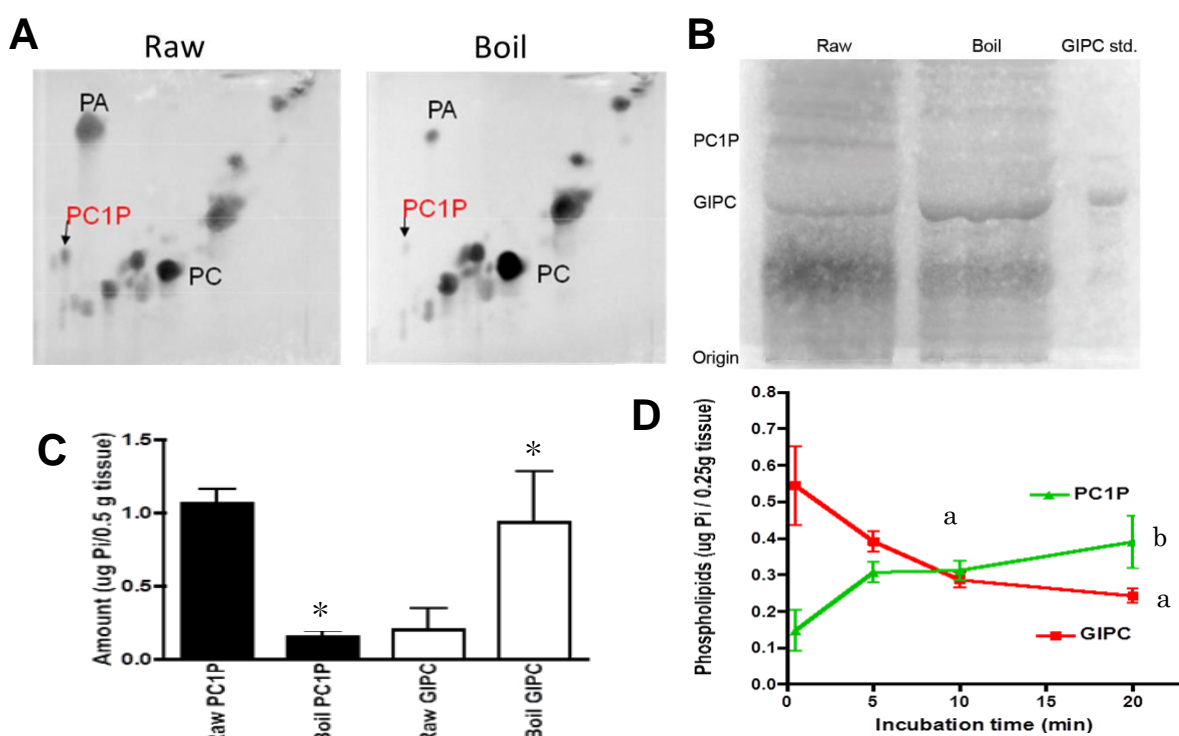


Fig. 11 キャベツホモジネートにおける GIPC からの PC1P 生成

(A) 生及び煮沸したキャベツ抽出脂質の二次元 TLC (B) 生及び煮沸したキャベツ抽出脂質の一次元 TLC。[2-プロパノール:ヘキサン:水=55:20:25 (v/v/v)] の下層 (solvent A) を用いて脂質を抽出し、[クロロホルム:メタノール:7.9%アンモニア=45:35:10 (v/v/v)] で展開溶媒に用いる TLC で展開した。プリムリン試薬を噴霧し、UV 光下で可視化した。(C) 生及び煮沸したキャベツ組織に含まれる PC1P と GIPC 量。データは Mean \pm S.D. n=3 で示している。*は生及び煮沸したキャベツ脂質との比較で有意差あり ($P < 0.05$) を示す。(D) -80°C で凍結したキャベツ葉から得たホモジネートを所定の時間、 30°C でインキュベートした。各インキュベート時間で得られた PC1P と GIPC を TLC で単離し定量を行った。データは Mean \pm S.D. n=3 で示している。a: 0.5 分の GIPC 量と有意差あり ($P < 0.05$) を示す。b: 0.5 分の PC1P 量と有意差あり ($P < 0.05$) を示す。

分かった (Fig. 11C)。また、キャベツホモジネートを 30℃でインキュベートした結果、時間依存的な GIPC の減少とそれに伴った PC1P の増加が見られた (Fig. 11D)。以上より、キャベツには GIPC から PC1P を生成する酵素が存在し、ホモジネートにする際に活性化している可能性が考えられた。

(4) *in vitro*における GIPC からの PC1P 生成

Fig. 11 よりキャベツにはホモジネートの際に活性化される酵素が存在し、その酵素を介して GIPC から PC1P が生成する可能性が示唆された。GIPC は市販の標準品が存在しないため、キャベツ葉より第二章に述べる方法を用いて GIPC を調製した。この GIPC を基質として、キャベツホモジネートより調製した 13k 沈殿画分を酵素源として 5 分間、30℃でインキュベートすることで生成物 PC1P が生じるかを調べた。その結果、基質である GIPC の増加に伴い、生成する PC1P が増加した。更に、GIPC の 200 μ M 以上で飽和現象が見られることより、この反応は典型的な Michaelis-Menten 速度式に従うことが分かった (Fig. 12A, K_m : 110 μ M)。また、MALDI-TOF MS の結果より GIPC の 13k 沈殿画分処理

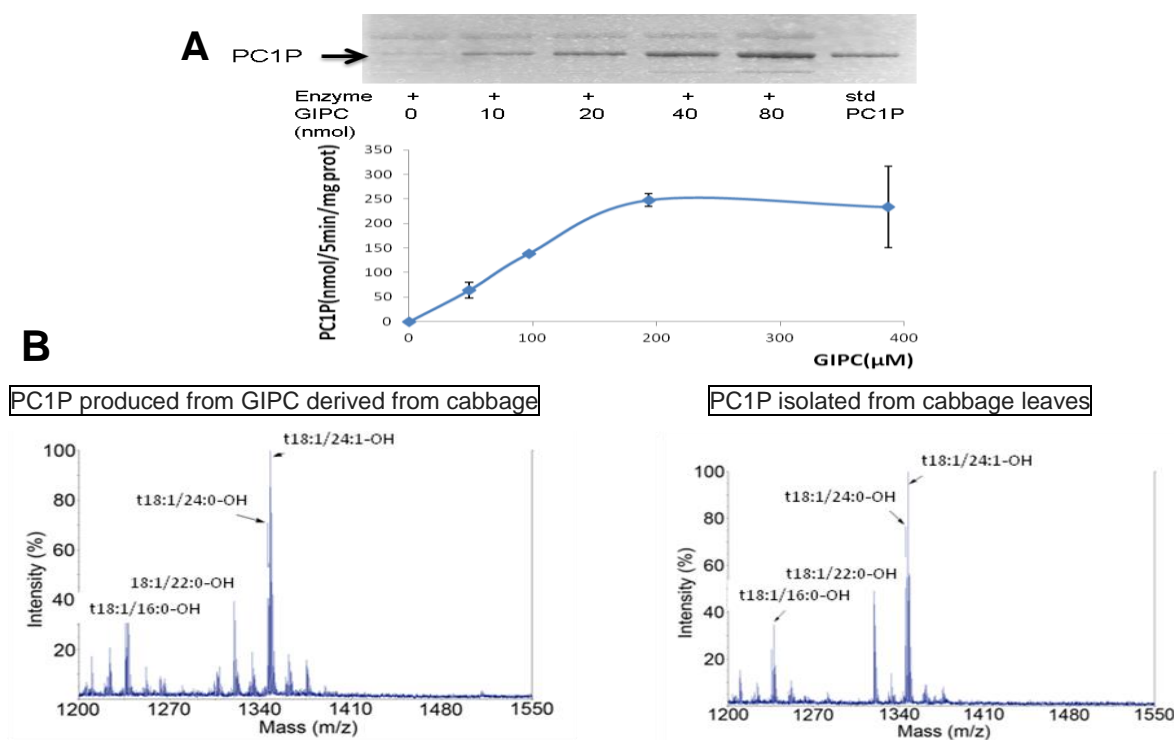


Fig. 12 *in vitro*における GIPC から PC1P の生成

(A) キャベツホモジネートの 13k 沈殿画分 (酵素源) と様々な濃度の GIPC (基質) を 5 分間、30℃でインキュベートした。得られた PC1P は TLC で単離し定量した。GIPC: 0 nmol ~ 80 nmol までの PC1P の変化を示す TLC は図上部に示している。また、データは Mean \pm S.D. $n=3$ で示している。(B) キャベツ由来の GIPC から生成した PC1P (左) とキャベツ葉から直接抽出した PC1P (右) のそれぞれの分子種組成を Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS (陽イオン検出モード) で調べた。

によって生成した PC1P とキャベツより抽出した脂質から得た PC1P の分子種組成はほぼ一致していた (Fig. 12B)。

2-2 (1) ~ (4) の結果は、PC1P が GIPC の加水分解によって生じることを強く示した (Fig. 13)。酵母 [32] 及びクリプトコッカス [33] においてイノシトールホスホセラミド (IPC) の C 位置で加水分解し、セラミド及びホスホイノシトールを生成する酵素を「IPC-ホスホリパーゼ C (IPC-PLC)」と呼ぶ。そこで、私は GIPC の D 位置で加水分解し、PC1P 及びグリコシルイノシトールを生成する酵素を「GIPC-PLD」と命名した。

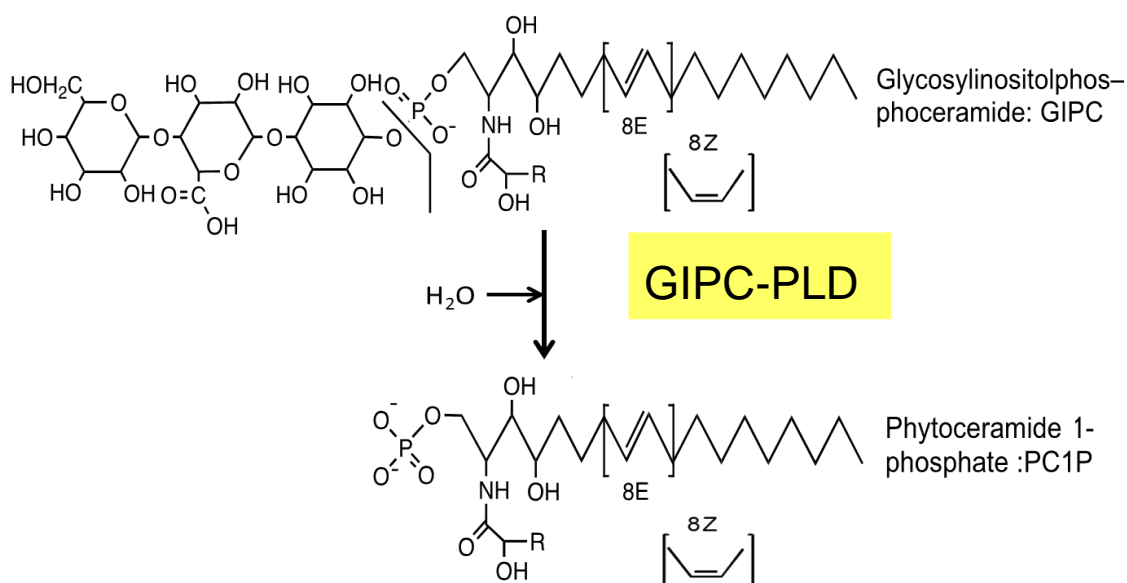


Fig. 13 PC1P の生合成経路

2-3 GIPC-PLD 活性の性質

(1) GIPC-PLD 活性の至適条件の検討

一般にキャベツは PC を加水分解して PA を生成する PLD (PC-PLD) 活性が高いことで知られている。しかし、GIPC に市販のキャベツ由来 PLD や本研究室で調製したキャベツ由来 PLD を作用させても加水分解反応は進行せず、PC1P は生じなかった (後述 Fig. 16B) ため、GIPC-PLD は、既知の PLD とは異なる新規の PLD の可能性が示唆された。そこで、PC-PLD と比較しながら GIPC-PLD の性質について調べることにした。まず、様々な pH において酵素活性を調べたところ、GIPC-PLD は pH7.4 (中性) で最も高い活性を示すことが分かった (Fig. 14A)。一方、PC-PLD は pH5.8 (酸性) で最も高い活性を示した (Fig. 14A)。次に、 CaCl_2 もしくは 2 価カチオンキレート剤である EDTA を加えることで、これらの酵素における Ca^{2+} 要求性を調べた。その結果、GIPC-PLD は最大活性に Ca^{2+} を要求するものの、 Ca^{2+} 非存在下で最大活性の 70% を保持しており、 Ca^{2+} 非依存型酵素であることが分かった (Fig. 14B)。一方、PC-PLD は Ca^{2+} を必要とし、 Ca^{2+} 非存在下では活性をほとんど示さなかった (Fig. 14B)。

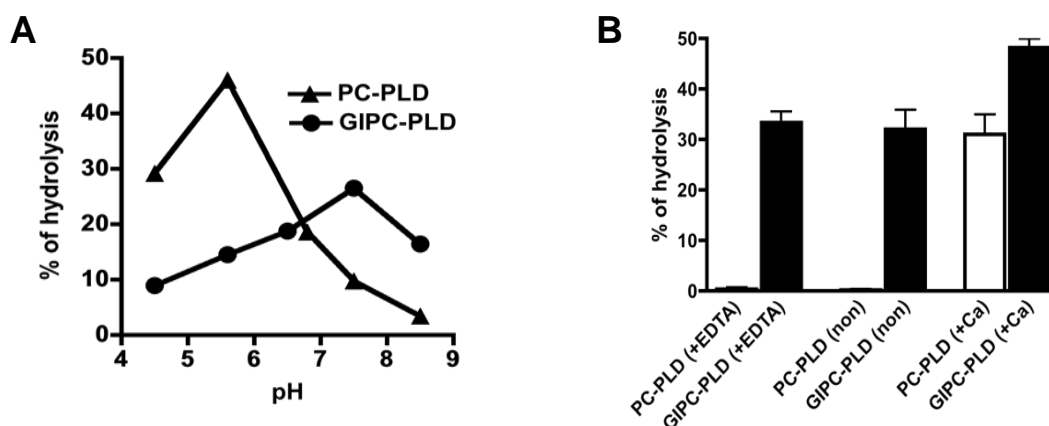


Fig. 14 GIPC-PLD 活性における pH、 Ca^{2+} の影響

(A) PC-PLD、GIPC-PLD のそれぞれの pH の影響を調べるために様々な pH で酵素アッセイを行った。この時、PC-PLD アッセイは 10 mM のカルシウムを加えて行い、GIPC-PLD アッセイは 10 mM のカルシウムを加えず行った。データは単一の実験で決定した。(B) PC-PLD、GIPC-PLD のそれぞれの Ca^{2+} の影響を調べるために 10 mM のカルシウムもしくは 1 mM EDTA を加えて酵素アッセイを行った。(non) はどちらも加えていないことを示す。データは Mean \pm S. D. $n=3$ で示している。(A, B) PC-PLD はキャベツ葉、GIPC-PLD はキャベツホモジネートの 100 k 沈殿画分よりそれぞれ調製した。また基質として PC 及び GIPC をそれぞれ用いて PC-PLD 及び GIPC-PLD 活性を測定した。

以上の結果より、至適 pH や Ca^{2+} 要求性において GIPC-PLD は PC-PLD と異なる性質を持つことが示された。

また、デオキシコール酸ナトリウム (NaDOC) またはジエチルエーテル (DE) を添加することで GIPC-PLD 活性が有意に高くなることが分かった (Fig. 15)。これは GIPC-PLD が疎水性環境で活性化されることを示唆する。

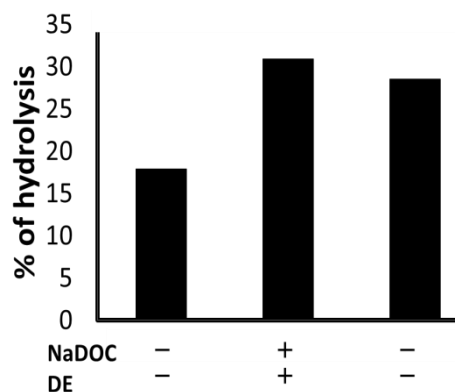


Fig. 15 GIPC-PLD 活性における界面活性剤・ジエチルエーテルの影響

GIPC-PLD の界面活性剤・ジエチルエーテルの影響を調べるために 2 mg のデオキシコール酸 (NaDOC) もしくは 1 ml のジエチルエーテル (DE) を加えて酵素アッセイを行った。データは単一の実験で決定した。GIPC-PLD はキャベツホモジネートの 100 k 沈殿画分より調製し、基質として GIPC を用いて GIPC-PLD 活性を測定した。

(2) GIPC-PLD の基質特異性

キャベツホモジネートの 100k 沈殿画分を Triton X-100 で可溶化し、飽和硫酸 (60%飽和) で沈殿させ、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行い、部分精製した GIPC-PLD を得た。部分精製した GIPC-PLD の比活性は 100k 沈殿画分の 6 倍 ~ 8 倍であった。この GIPC-PLD を用いて GIPC-PLD の基質特異性を調べた。その結果、GIPC-PLD が GIPC を最も加水分解する条件において、PC は全く分解されないことが分かった (Fig. 16A)。一方、キャベツ葉から調製した粗精製 PC-PLD が PC を最も加水分解する条件において、GIPC は全く分解されないことが分かった (Fig. 16B)。また、部分精製した GIPC-PLD は PC 以外の PE や PI、及び同じスフィンゴリン脂質の SphM を分解しないことが分かった (Fig. 16C)。

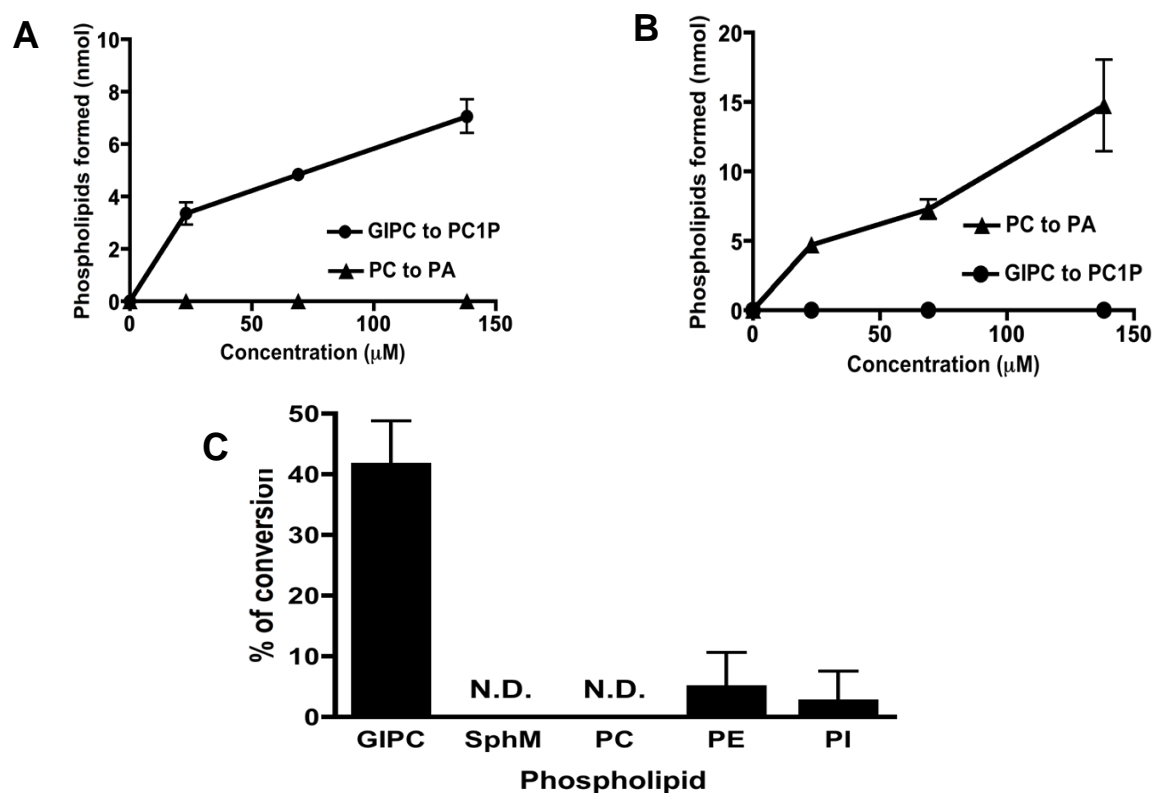


Fig. 16 GIPC-PLD の基質特異性

(A) GIPC-PLD 至適条件 (pH7.4、NaDOC 存在下、 Ca^{2+} 無し) での PC-PLD 及び GIPC-PLD 活性を調べた。(B) PC-PLD 至適条件 (pH5.8、DE 及び 10 mM Ca^{2+} 存在下) での PC-PLD 及び GIPC-PLD 活性を調べた。(A, B) PC-PLD はキャベツ葉、GIPC-PLD はキャベツホモジネートの 100 k 沈殿画分よりそれぞれ調製した。また基質として PC 及び GIPC をそれぞれ用いて PC-PLD 及び GIPC-PLD 活性を測定した。データは Mean \pm S.D. n=3 で示している。(C) キャベツより部分精製した GIPC-PLD を用いて GIPC-PLD の基質特異性を調べた。使用した基質は、キャベツ GIPC、ウシ脳から得た SphM、卵黄から得た PC、PE 及び大豆から得た PI の 5 種類となる。データは Mean \pm S.D. n=3 で示している。

2-3 (1) ~ (2) の結果より、GIPC を加水分解して PC1P を生じる酵素は従来から知られる PC-PLD ではなく、GIPC 特異的な新規の PLD であると思われた。

(3) GIPC-PLD の細胞内分布

GIPC-PLD の細胞内の局在性を調べたところ、キャベツにおける GIPC-PLD 活性は Fig. 17A に示すように膜画分 (13k 沈殿、100k 沈殿) で高い比活性で検出された。ここでキャベツと同じアブラナ科でモデル植物でもあるシロイヌナズナにおいても同様に調べた。その結果、GIPC-PLD の総活性は可溶性画分 (100k 上清) と膜画分 (13k 沈殿、100k 沈殿) で同程度であった (Fig. 17B)。また、比活性はキャベツと同様に可溶性画分 (100k 上清) より膜画分 (13k 沈殿、100k 沈殿) で高いことが見出された (Fig. 17C)。これらの結果より、GIPC-PLD は可溶性画分、膜画分共に存在する酵素であることが分かった。

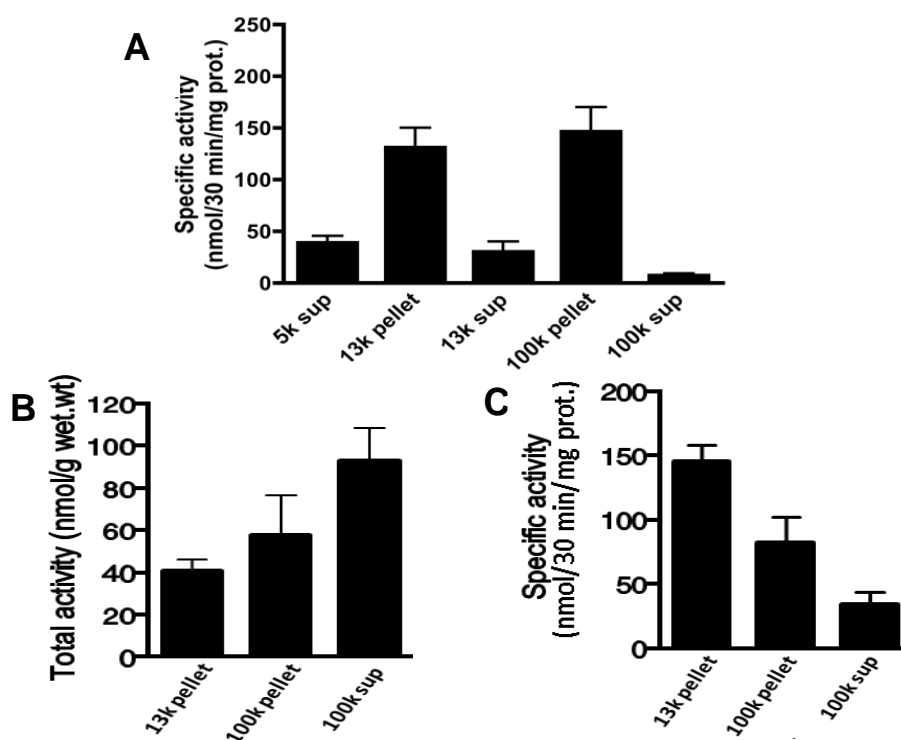


Fig. 17 GIPC-PLD の細胞内分布

(A) キャベツホモジネートを遠心分離によって分画した。この時得た各画分を酵素源として、キャベツ由来の GIPC と 30 分間反応させ、酵素 1 mg あたりの PC1P 生成量を比活性として調べた。(B, C) シロイヌナズナホモジネートを遠心分離によって分画した。この時得た各画分を酵素源として、キャベツ由来の GIPC と 30 分間反応させ得た PC1P 生成量を総活性 (B)、酵素 1 mg あたりの PC1P 生成量を比活性 (C) として調べた。(A, B, C) GIPC-PLD アッセイは pH7.4、NaDOC の存在下で行った。データは Mean±S.D. n=3 で示している。

2-4 植物における GIPC-PLD の役割

(1) 植物における GIPC-PLD 活性の分布

GIPC-PLD がキャベツやシロイヌナズナの他の植物にも存在するかどうかを調べた。アブラナ科の植物として、キャベツ、シロイヌナズナ、ダイコン、コマツナ、ブロッコリー、アブラナ科以外の植物として、ネギ、緑豆モヤシ、ゴボウ、ニンジン、キュウリについて各種組織の GIPC-PLD 活性を調べた (Fig. 18A)。その結果、GIPC-PLD はアブラナ科の植物で高い活性が見出された。アブラナ科以外の植物であるネギ、緑豆モヤシ、ゴボウ、ニンジンにも活性が見られた。これは GIPC-PLD は植物に広く分布する酵素であることが示唆する。また、同じ植物の各種組織における GIPC-PLD 活性の分布の比較も行った。アブラナ科植物において根の GIPC-PLD 活性は成熟した葉の活性よりも高いことを見出した。ブロッコリーの場合、GIPC-PLD 活性は茎、花及び根において検出可能であったが、成熟した緑の葉では検出されなかった。キャベツの場合、白い内側の未熟な葉は成熟した外側の緑の葉や茎よりも有意に高い GIPC-PLD 活性を示した。アブラナ科以外の植物であるネギの場合も同様に、根の近くに位置する若葉は上部の成熟した外葉よりも有意に高い GIPC-PLD 活性を有することが分かった。これらの結果は GIPC-PLD 活性が成長の著しい部位で高いことを示した。更に、組織成熟中の酵素活性の変化を知るために、様々な成長段階での緑豆モヤシの酵素活性を調べた。その結果、緑豆モヤシにおいて出芽期 (播種後 3 日 ~ 4 日) の葉、茎及び根の GIPC-PLD 活性が成熟期 (播種後 14 日 ~ 28 日) のものより有意に高いことが分かった (Fig. 19)。以上の結果より GIPC-PLD は植物の成長に関与する酵素である可能性が示唆された。

(2) 植物における PC1P 及び GIPC の分布と分子種の解析

酵素の基質と生成物の分布は酵素の生理学的意義を解明するための重要な情報である。そこで GIPC-PLD の基質である GIPC と生成物である PC1P の植物におけるそれぞれの分布について調べた。まず、第二章に示す方法を用いて GIPC を単離し、MALDI TOF-MS によってその構造を確認した。GIPC の分子種を解析したところ、アブラナ科のダイコンでは $t18:1/16:0h$ の分子種は含まないがキャベツやシロイヌナズナと類似の分子種が見られた (Fig. 20A)。非アブラナ科の西洋ネギ (*Allium porrum*) ではアブラナ科の植物には含まれない $t18:1/21:0h$, $t18:1/23:0h$ の奇数鎖脂肪酸を有する分子種が含まれていた (Fig. 20B)。このように植物種により若干の GIPC の分子種の違いが見られた。しかしながら、GIPC は植物種に関わらず、50 nmol/g ~ 280nmol/g (湿潤重量) 程度、広く分布することが分かった (Fig. 18B)。次に GIPC 同様にダイコンと西洋ネギ (*Allium porrum*) における PC1P の分子種を調べた。その結果、同じアブラナ科のダイコンでは PC1P の主要な分子種は GIPC のものとはほとんど同一であった (Fig. 21A)。非アブラナ科の西洋ネギ (*Allium porrum*) では GIPC で豊富に観察された奇数鎖脂肪酸 (21:0h, 23:0h) を有する分子種は PC1P では希少な分子種であった。逆に偶数鎖脂肪酸 (22:0h, 24:0h) を有する分子種が PC1P では観

察された (Fig. 21B)。また、PC1P は GIPC-PLD 活性が高いことが確認された植物種や部位 (Fig. 18A) に限定して分布していることが分かった (Fig. 18C)。このことから GIPC-PLD 活性が組織ホモジネート中の PC1P 量を決定することが示唆された。PC1P 量はキャベツの根、ダイコンの根でそれぞれ全リン脂質中 6.6%、5.1%であった (Table 3)。ホモジネート前に植物組織を煮沸させると、生の組織に比べて PC1P 量が低下すること (Fig. 11A) や、短時間煮沸中に PC1P が分解しないこと (データ未掲載) より、PC1P は植物組織のホモジネート中に酵素が働くことで生成されることが示された。

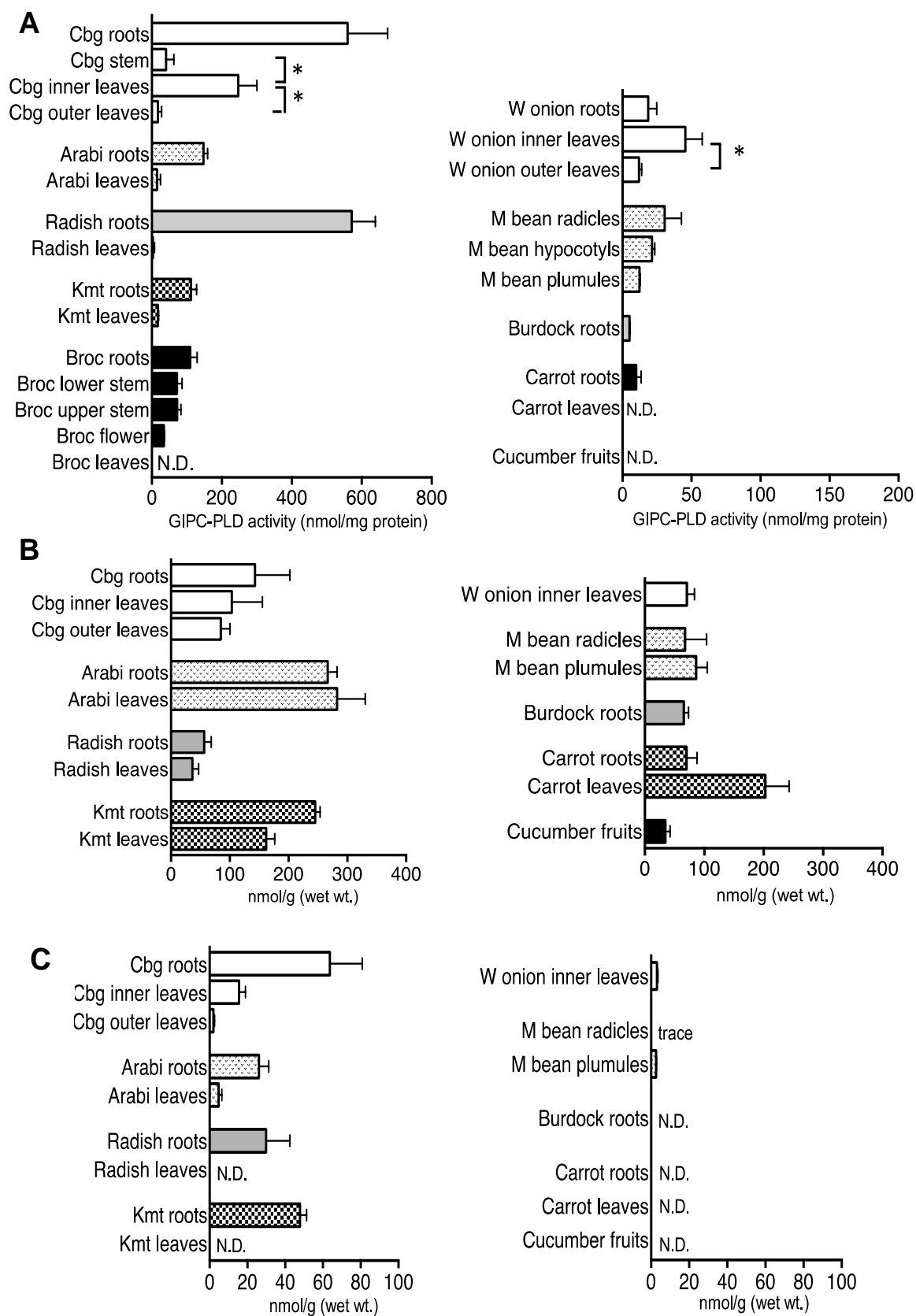


Fig. 18 植物における GIPC-PLD, GIPC, PC1P の分布

アブラナ科の植物:キャベツ (Cbg)、シロイヌナズナ (Arabi)、ダイコン (Radish)、コマツナ (Kmt)、ブロッコリー (Broc) の 5 種、アブラナ科以外の植物:ネギ (W onion)、緑豆モヤシ (M bean)、ゴボウ (Burdock)、ニンジン (Carrot)、キュウリ (Cucumber) について GIPC-PLD, GIPC, PC1P の分布を調べた。(A) 各植物組織のホモジネートの 13k 沈殿画分を酵素源として使用した。GIPC をこの沈殿画分と共に 30 分間、30°C でインキュベートすることで酵素アッセイを行った。* は各項目の比較で有意差あり ($P < 0.05$) を示す。データは Mean \pm S. D. $n=4$ で示している。(B, C) TLC により GIPC (B) 及び PC1P (C) を植物組織の脂質抽出物から単離し、それらのリン脂質を定量した。N. D.: 検出限界以下を示す。データは Mean \pm S. D. $n=3 \sim 4$ で示している。

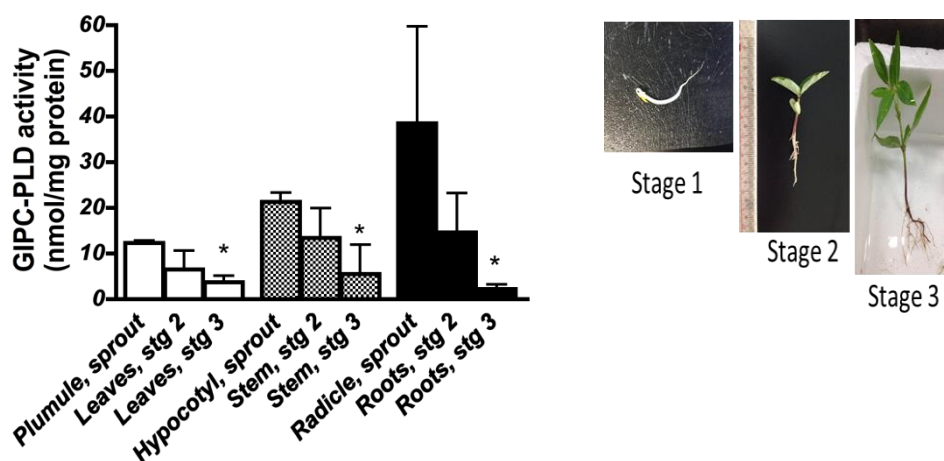


Fig. 19 種々の成長段階における緑豆モヤシの GIPC-PLD 活性

緑豆モヤシは 23°C ~ 28°C で栽培し、播種後 3 日目 ~ 4 日目 (Stage 1, 出芽期)、7 日目 ~ 14 日目 (Stage 2) 及び 14 日目 ~ 28 日目 (Stage 3) に収穫した。各植物組織のホモジネートの 13k 沈殿画分を酵素源として使用した。GIPC をこの沈殿画分と共に 30 分間、30°C でインキュベートすることで酵素アッセイを行った。* は出芽期との比較で有意差あり ($P < 0.05$) を示す。データは Mean \pm S. D. $n=3 \sim 4$ で示している。

※挿入した写真は、各成長段階における緑豆モヤシの一例である。

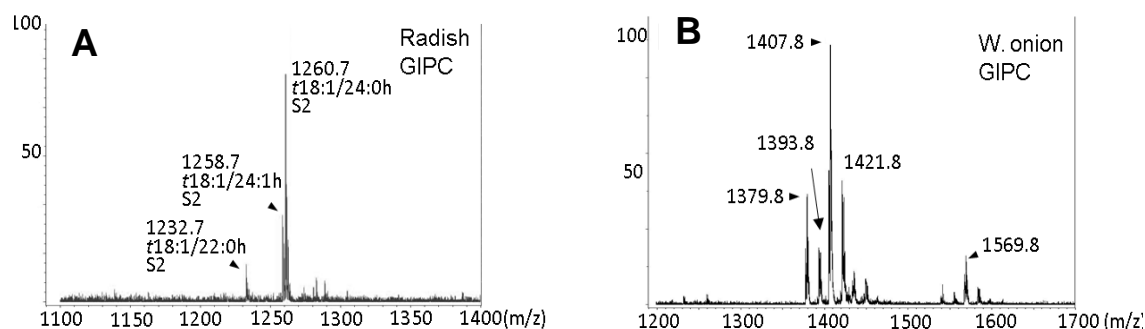


Fig. 20 MALDI-TOF MS (陰イオン検出モード) による各種植物の GIPC の分析

ダイコンの根、西洋ネギの葉から単離した GIPC をそれぞれ MALDI-TOF MS で調べた。(A) ダイコンの GIPC の主な分子種はフィトスフィンゲニン (t18:1) と鎖長の異なる α -ヒドロキシ脂肪酸 (22:0h, 24:0h, 24:1h) からなるセラミド構造を持つ。検出された GIPC の極性頭部は hexose-hexuronic acid-inositol リン酸型と帰属された。(B) 西洋ネギの GIPC の主な分子種はフィトスフィンゲニン (t18:1) と鎖長の異なる α -ヒドロキシ脂肪酸 (21:0h, 22:0h, 23:0h, 24:0h) からなるセラミド構造を持つ。過去の報告 [34] より検出された GIPC の極性頭部は hexose-hexosamine-hexuronic acid-inositol リン酸型と帰属された。

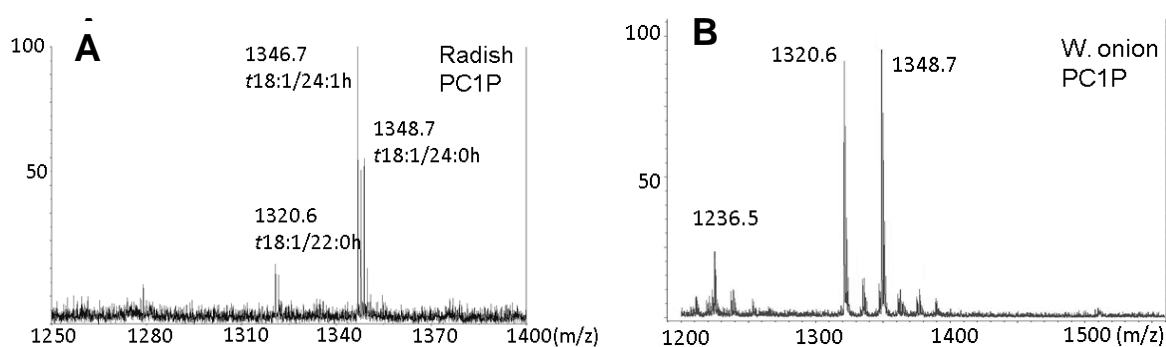


Fig. 21 MALDI-TOF MS (陽イオン検出モード) による各種植物の PC1P の分析

ダイコンの根、西洋ネギの葉から単離した PC1P をそれぞれ MALDI-TOF MS で調べた。(A) ダイコンの PC1P の主な分子種はフィトスフィンゲニン (t18:1) と鎖長の異なる α -ヒドロキシ脂肪酸 (22:0h, 24:0h, 24:1h) からなるセラミド構造を持つ。(B) 西洋ネギの PC1P の主な分子種はフィトスフィンゲニン (t18:1) と鎖長の異なる α -ヒドロキシ脂肪酸 (22:0h, 24:0h) からなるセラミド構造を持つと推測される。

Table 3 生及び煮沸したキャベツ・ダイコンの根における PC1P, 総リン脂質の量と

総リン脂質における PC1P の割合

生及び煮沸した組織から脂質抽出を行った。TLC により単離した PC1P と総リン脂質を定量した。データは Mean \pm S. D. n=3 ~ 4 で示している。

植物種	PC1P	総リン脂質	PC1P
	nmol g wet wt.	nmol/g wet. wt	% of total phospholipid
キャベツ			
生	64 \pm 17	1680 \pm 630	6.6 \pm 3.0
煮沸	14 \pm 2.0	1700 \pm 170	0.8 \pm 0.1
ダイコン			
生	30 \pm 13	540 \pm 250	5.1 \pm 0.4
煮沸	3.7 \pm 0.94	70 \pm 280	1.8 \pm 1.0

第3節 考察

私は本研究において、キャベツ脂質に未知リン脂質を見出し、これを4種の α -ヒドロキシ脂肪酸 (C16:0, C22:0, C24:0, C24:1) を含有する PC1P と決定した。これは弱アルカリ耐性試験、Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS、GC-MS による *N*-アシル鎖の解析、TOF MS による精密質量分析の結果より導かれた結論である。まず、未知リン脂質は弱アルカリに耐性であることから、グリセロ型リン脂質ではなくスフィンゴ型リン脂質と推定された (Fig. 2)。次に、未知リン脂質は MALDI-TOF MS において、リン酸モノエステルと特異的に結合する Phos-tag との複合体として検出されることからリン酸モノエステル残基を極性頭部構造とする4種のスフィンゴ脂質ホモログであると推定された (Fig. 3)。また、未知リン脂質から調製した脂肪酸メチルエステルの GC-MS により、4種の α -ヒドロキシ脂肪酸 (16:0, 22:0, 24:0, 24:1) が検出され、このスフィンゴリン脂質は異なる α -ヒドロキシ型 *N*-アシル鎖を持つ4種の分子種から成っていることが示唆された (Fig. 4)。さらに、この未知リン脂質の酸分解産物の質量分析より、長鎖塩基が4-ヒドロキシスフィンゲニン (*tl*18:1) であることが確認され、未知リン脂質はフィト型セラミド 1-リン酸であると推定された (Fig. 5)。高分解能質量分析においては、この推定に基づく原子組成と実測値から推定される原子組成とはよく一致した。(Table 1, Fig. 7)。私の知る限り、植物組織で C1P を見出した報告はない。このクラスのリン脂質が植物に存在することを示したのは本研究が初めてである。

PC1P の生合成について想定した経路は1) セラミドキナーゼによるセラミドのリン酸化、2) GIPC の加水分解の2つである。動物細胞の C1P はセラミドがセラミドキナーゼによるリン酸化を受けて生成される [35, 36]。シロイヌナズナやイネでもセラミドキナーゼが単離同定されており [37, 38]、リコンビナントセラミドキナーゼと [³²P] ATP を用いた [³²P] C1P の生成が *in vitro* 実験で行われている [37, 38] ことから、1) のセラミドのリン酸化経路の可能性が高いと思われた。しかしながら、本研究により大部分の PC1P は2) の GIPC の加水分解によって生成することが判明した。これは、GIPC と PC1P の分子種組成の類似が LC-MS/MS で確認されたこと (Fig. 12)、キャベツ葉をホモジネートとしてインキュベートすると、PC1P の増加量に見合う GIPC の減少が観察されたこと (Fig. 13)、キャベツより精製した GIPC にキャベツホモジネートの 13k 沈殿画分を作用させると、GIPC 濃度依存的に PC1P が生じ、生成した PC1P とキャベツ脂質から得た PC1P の分子種組成は完全に一致したことがその証拠である (Fig. 14)。また、シロイヌナズナ (葉抽出液) において、GIPC とセラミドの構成比率がそれぞれ全スフィンゴリン脂質中 64%と 2%であること [10] を考えれば、セラミドのリン酸化によって、GIPC と等量の PC1P を作り出すことは不可能に近い。PC1P が見出される組織と GIPC-PLD 活性が高い組織がよく一致していることも、GIPC の分解酵素が組織中で検出される PC1P の大部分を作り出していることを示

唆している。

キャベツやシロイヌナズナに見出された GIPC から PC1P を生成する PLD 活性は PC などのグリセロリン脂質や SphM などの他のスフィンゴリン脂質とは反応せず、GIPC 特異的に加水分解する (Fig. 18C)。そこで我々はこの酵素を GIPC-PLD と名付けた。GIPC-PLD は基質特異性のみならず、最大活性に Ca^{2+} を要求するものの Ca^{2+} 非存在下で最大活性の 70% を保持しており、 Ca^{2+} 非依存型酵素であること、至適 pH が 7.4 (中性) であることなど既知の PC-PLD の性質 (mM レベルの Ca^{2+} 要求性、至適 pH が 5.5 (酸性)) と異なることが確認された (Fig. 16 A, B)。更に、GIPC-PLD が GIPC を最も加水分解する条件において、PC は全く分解されないこと (Fig. 18A)、PC-PLD が PC を最も加水分解する条件において、GIPC は全く分解されないことが分かった (Fig. 18B)。GIPC-PLD 活性が PC だけでなく、PI や SphM も基質としないことも確認された (Fig. 18C)。このような性質の酵素は未だ報告がない。また GIPC の分解酵素として知られている酵素は、酵母 [32] 及びクリプトコッカス [33] の (G) IPC をセラミド部分とリン酸との間 (C 位置) で加水分解する酵素 IPC-PLC のみであり、(G) IPC を D 位置で加水分解する酵素 IPC-PLD の報告はない。この研究で見出された GIPC-PLD 活性は GIPC の D 位置での加水分解を触媒する酵素活性の存在を示した初めての報告となる。

GIPC-PLD はアブラナ科の植物で高い活性が見出された。アブラナ科以外の植物であるネギ、緑豆モヤシ、ゴボウ、ニンジンにも活性が見られた。キュウリの GIPC-PLD 活性は確認されなかったものの、GIPC-PLD は植物に広く分布する酵素であることが示唆された (Fig. 17A)。また、GIPC-PLD はほとんどの植物において葉や茎より根で高く、キャベツおよびネギにおいては成熟した外葉より未成熟な内葉で高いことが示された (Fig. 17A)。更に緑豆モヤシにおいて出芽期 (播種後 3 日 ~ 4 日) の葉、茎及び根の GIPC-PLD 活性が成熟期 (播種後 14 日 ~ 28 日) のものより有意に高いことが分かった (Fig. 21)。このように GIPC-PLD 活性が活発に成長している部分に高いことより、本酵素は植物の成長に関与する可能性が示唆された。GIPC-PLD 活性がどのように植物の成長に関与するかは不明であるが、過去の報告と考え合わせると 2 つの仮説が考えられる。1 つ目の仮説はシグナル性因子の放出である (Fig. 22 左)。GIPC-PLD は PC1P と共に糖鎖を遊離させる (Fig. 15)。この時に遊離される糖鎖の一つであるマンノピラノシル-グルクロンピラノシル-イノシトール (MGI) はバラ細胞増殖時に培地に蓄積することが報告されている [39]。この論文の著者らは放出された MGI のシグナリングの役割を仮定し、糖脂質が MGI の供給源の可能性を示唆した。本研究で示した GIPC-PLD 活性の生成物の 1 つは MGI である。MGI にそのような機能があるならば、GIPC-PLD が細胞増殖に必要な MGI を遊離させているのかもしれない。またもう一方の生成物である PC1P は 1) ホモジナイズの後の組織で含量が増えること、2) 生の組織と比較して煮沸した組織において含量が非常に低くなること (Fig. 13A)、3) 高い GIPC-PLD 活性を示す組織においてのみ検出可能であること (Fig. 20B) が

示された。これらの結果は、PC1P が構成的膜成分ではなく、GIPC-PLD 活性によって専ら一過性に生成される分子であることを示す。植物組織において、セラミドのリン酸化によって産生される C1P は動物細胞と同様に抗アポトーシス性分子とみなされている[20]。本研究で確認された PC1P が植物細胞において同様の役割を果たすかどうかは不明であるが、PC1P が細胞活動の活発な組織に存在することから何らかのシグナル性分子として働いているのかもしれない。2つ目の仮説は成長に関わるグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質の遊離である (Fig. 22 右)。GIPCは細胞膜に存在し [9]、GPI アンカーとして機能する [40, 41] と推定されている。GPI アンカー型タンパク質の一種であるアラビノガラクタンタンパク質 (AGP) は根の成長、細胞の増殖および促進に関与すると考えられている [42, 43]。Oxley と Bacic はセイヨウナシ (*Pyrus communis*) のインタクトな AGP および遊離型 AGP を比較し、遊離型では AGP のホスホセラミド部分が欠失していることを見出した。Oxley と Bacic は AGP の放出に PLD 活性が関与していると考えしている [40]。本研究で見出された酵素が彼らの想定した反応を触媒する酵素なのかかもしれない。GIPC-PLD が GPI アンカーに繋ぎ止められた機能タンパク質を外す役割を果たすとする、この酵素は組織成長の活発な組織にあって、成長に必要な AGP のようなアンカーされたタンパク質を放出させるのかもしれない。

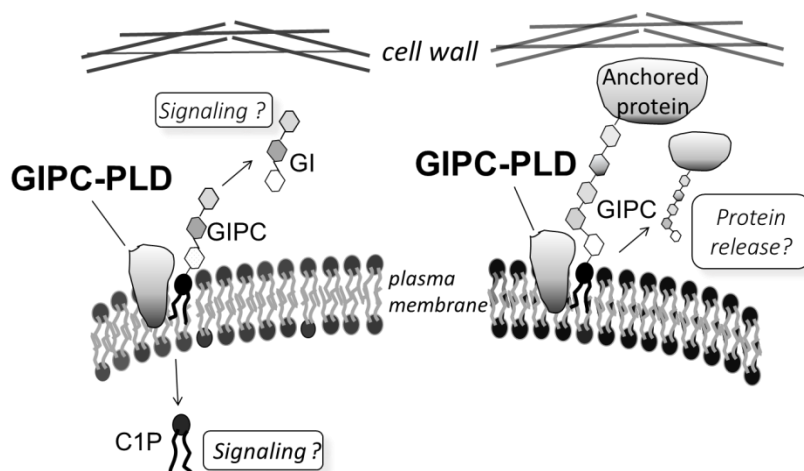


Fig. 22 植物における GIPC-PLD の生体内での機序 (仮説)

考えられる 2 つの仮説について模式図で示す。左) GIPC-PLD が GIPC を D 位置で加水分解することでシグナル分子としてグリコシルイノシトール (GI) とセラミド 1-リン酸 (C1P) を生成する。右) GIPC-PLD が GIPC を D 位置で加水分解することでアンカー型タンパク質を放出する。

GIPC-PLD 活性は可溶性画分 (100k 上清) でも膜画分 (13k 沈殿、100k 沈殿) でも確認された (Fig. 19B)。膜画分と可溶性画分に存在する GIPC-PLD は同じ酵素とすると、水素結合、もしくはファンデルワールス力で緩く膜に結合していると考えられる。このこと

を確認するために膜画分を0.1 M炭酸ナトリウムで処理することで、細胞膜から GIPC-PLD が放出されるかを調べた。その結果、GIPC-PLD は弱アルカリ処理によって膜から放出されないことが分かった（データ未掲載）。これは膜画分の GIPC-PLD は膜に強固に結合しているのかもしれないこと、膜画分と可溶性画分の GIPC-PLD は異なる性質や特徴を持つ酵素かもしれないことを示唆する。ただし、膜画分に存在する酵素活性は短時間の超音波処理により細胞質画分に移行するという結果（データ未掲載）もある。これは膜画分の GIPC-PLD が膜に強固に結合しているのではなく、超音波のような刺激で膜から遊離することを示唆し、前述の結果と相反するものである。今後、GIPC-PLD の膜結合性は更なる検討が必要である。

植物細胞の病原菌の感染によって生じる細胞死や植物が能動的に引き起こすプログラム細胞死は、動物細胞と同様にセラミドのリン酸化と非リン酸化のバランスによって決定すると提唱されている [20]。一般に、セラミドは細胞増殖の阻害やアポトーシス誘導を引き起こし、C1P は細胞遊走活性や抗アポトーシス活性を示す [20]。これまでこのバランスを考える際、セラミドからの直接リン酸化経路でのみ考えられてきた。しかし、本研究で GIPC の分解により PC1P を生成する経路が見出された。これは、スフィンゴ脂質の代謝バランスと細胞死との関係において新しい知見を提供すると考えられる。例えば、シロイヌナズナの IPC 合成酵素をコードする遺伝子 (ERH1) 変異体において細胞死が促進される [44]。このことはセラミドの蓄積（細胞死シグナルの上昇）だけでなく、GIPC 由来の PC1P の減少（生存シグナルの低下）によって、バランスが崩れることによるのかもしれない。

植物においてスフィンゴ脂質は、細胞の生存以外にも気孔の開閉や発生、成長および生殖において重要なシグナル分子として機能する。本論文において、私は植物が普遍的に GIPC から PC1P への変換経路を持っている可能性を示した。この反応を触媒する GIPC-PLD の生理的役割は本酵素がクローニングされればノックアウト植物の表現型から解析出来るであろう。このような解析から得られる知見は植物の主要なスフィンゴ脂質でありながら長年研究が進んでいなかった GIPC について推定されているアンカー型タンパク質のアンカーとしての役割やシグナル伝達物質の前駆物質といった生理的役割の解明に繋がると期待される。特に植物の成長に GIPC-PLD が関与することが証明されれば、農産物の収量増や農薬の開発といった応用研究の進展も期待出来る。

第二章

GIPC および PC1P の摂取量と PC1P の消化性

序論

スフィンゴ脂質は真核生物の細胞膜を構成する成分であり、細胞の生存、分化、増殖、遊走など細胞機能の調節に関わるシグナル因子の産生源としても機能している [35]。また、スフィンゴ脂質の一種のセラミドは体表面の最外層を形成する角質で水分の蒸散量を低下させることで皮膚バリアの形成と保湿機能に関与する [45]。このような重要な生体機能を担うスフィンゴ脂質を我々は体内で生合成している一方で、食事からも摂取している [46]。近年、食事性スフィンゴ脂質に大腸がんの発症予防、炎症性大腸炎への緩和作用 [47-49] あるいは皮膚への保湿作用 [50, 51] が報告され、食事として摂取したスフィンゴ脂質が体内のスフィンゴ脂質代謝を介して生体機能に影響する可能性が指摘されている。しかしながら、これらの作用の詳細な機序については不明な点が多い。食事性スフィンゴ脂質の有益な作用を疾患予防や美容目的に利用するには、我々が普段食事より摂取しているスフィンゴ脂質の種類と摂取量、消化、吸収、代謝的運命についての知見が必要である。

食事から摂取されるスフィンゴ脂質は大きく動物性と植物性の 2 種類に分けられる。動物性スフィンゴ脂質の大半は SphM である。SphM は小腸でスフィンゴミエリナーゼによりセラミドに変換された後、セラミダーゼによって脂肪酸とスフィンゴシンに分解される。分解によって生じたスフィンゴシンの一部は小腸上皮細胞に取り込まれた後、スフィンゴ脂質として再利用されるが、大部分は脂肪酸に代謝された後に吸収される [46]。また、SphM の摂取量は成人で 1 日あたり 50 mg ~ 110 mg [52] 程度と報告されている。植物性の主要スフィンゴ脂質は GluCer と GIPC である。GluCer はグリコシルセラミダーゼによりセラミドに変換された後、同様に代謝、吸収されると報告されている [53]。また、GluCer の摂取量は成人で 1 日あたり 60 mg ~ 80 mg [52] 程度と報告されている。一方、GIPC はシロイヌナズナにおいて全スフィンゴ脂質の約 64%を示す [10] など植物における主要なスフィンゴ脂質でありながら、水溶性で抽出が難しいことより、このスフィンゴリン脂質の消化吸收や摂取量についてほとんど調べられていない。第一章で報告した GIPC の加水分解産物である PC1P も同様である。GluCer は皮膚バリア機能の向上に関わる機能性食品として知られている。Duan らは経口摂取された GluCer は生体内で分解されてスフィンゴイド塩基となり、このスフィンゴイド塩基が内因性のスフィンゴ脂質代謝を高めることで、保湿性に関わるスフィンゴ脂質の一つであるセラミドが合成され、皮膚の保湿としての機能に繋がっていると考察している [12]。GIPC やその分解物である PC1P がスフィンゴイド塩基の供給源として体内で作用するならば、これらも GluCer と同様な機能性食品として利用されるかもしれない。

本章において、私は GIPC 抽出方法について検討を行った後、様々な食品における GIPC と PC1P を定量した。その結果、GIPC は魚・肉・卵には含まれておらず、野菜に普遍的に存在しており、1 日の摂取量は推定約 50 mg であることが分かった。これは GluCer とほぼ同等であった。一方、PC1P はアブラナ科の野菜に主に存在し、100 g あたりに推定約 0.4 mg

～ 2 mg 含まれ、小腸で脱リン酸化を受け、フィトセラミドへと消化されることが示された [62] 。

第1節 実験方法

1-1 実験材料

マラカイトグリーン、七モリブデン酸六アンモニウム四水和物（粉末）、60%過塩素酸、28%アンモニア、塩酸（HCl）は関東化学株式会社製を用いた。プリムリンはナカライテスク製を用いた。TLCはMerck社（Dramstadt, Germany）製のTLC Silica gel 60（Glass plates, 20×20 cm）を用いた。有機溶媒などその他の試薬は特に断らない限り特級品を用いた。ウシ小腸由来アルカリホスファターゼはフナコシ株式会社製を用いた。本研究で用いた食材はアブラナ科植物としてキャベツ（*Brassica oleracea L. var. capitata*）・ダイコン（*Raphanus sativus L*）およびコマツナ（*Brassica rapa L*）を、マメ科植物の緑豆モヤシ（*Vigna radiate L*）を、ナス科植物のトマト（*Solanum lycopersicum L*）およびジャガイモ（*Solanum tuberosum L*）を、セリ科植物のニンジン（*Daucus carota L*）を、ユリ科植物のタマネギ（*Allium cepa L*）を、ウリ科植物のキュウリ（*Cucumis sativus L*）を、キク科植物のレタス（*Lactuca sativa L*）およびゴボウ（*Arctium lappa L*）の各野菜を用いた。穀類としてはイネ科植物の小麦（*Triticum aestivum L*）および精白米（*Oryza sativa subsp. Japonica L*）を用いた。動物性食材としては豚肉、鮭および鶏卵を用いた。これらの食材は生鮮食料品店にて購入した。

1-2 植物からの脂質の抽出と分析

(1) GIPC の単離

GIPCは水溶性であり、一般的なリン脂質の抽出方法であるBligh & Dyer法[25]では抽出が低い。そこでMarkhamらの報告した[2-プロパノール:ヘキサン:水=55:20:25 (v/v/v)]の下層(solvent A)を用いる抽出法[10]を改良した方法[27]を用いてGIPCを抽出した。まず、植物組織の破碎に伴って活性化するPLDなどの脂質分解酵素を不活性化するために5分間材料を煮沸した。その後、材料と等量のsolvent Aを加えてウルトラディスパーサー(LK-21、ヤマト化学株式会社製)を用いて5分間ホモジナイズを行った。得られたホモジネートを15分間、60℃で加熱した後、遠心分離(1,300×g、10分間、4℃)を行い、パスツールピペットを用いて上清を分取した。回収した上清と同量のsolvent Aを残渣に加え、同様の操作を繰り返して上清を再度分取した。得られた上清を減圧留去し、残渣に適量の[40%メチルアミン:エタノール=1:1 (v/v)]を加え、1時間、50℃で加熱することでアルカリ加水分解を行った。溶媒を減圧留去した後、[クロロホルム:メタノール:7.9%アンモニア=45:35:10 (v/v/v)]を展開溶媒に用いるTLCに供し、GIPCを単離した。得られたGIPCはリンモリブデンマラカイトグリーン法により比色定量した[26]。また精製したGIPCは、MALDI-TOF MSによる解析で構造を確認した。

(2) PC1P の単離

それぞれの食材の脂質を Bligh & Dyer 法 [Bligh 1959] に従って、クロロホルム/メタノール/水の二層分配系にて抽出した。得られた脂質を 0.1 N KOH (95%メタノール溶液) に溶解し、15 分間、60℃で加熱することでアルカリ加水分解を行った。冷却後、酸性条件下の Bligh & Dyer 法 [25] で脂質を回収し、抽出した脂質を [クロロホルム:メタノール:28%アンモニア=60:35:6 (v/v/v)] を展開溶媒に用いる TLC で展開し、PC1P を単離した。得られた PC1P はリンモリブデンマラカイトグリーン法により比色定量した [26]。

(3) MALDI-TOF MS

GIPC の適量を少量の 0.1%アンモニア性メタノールで溶解し、その 0.5 μ l をサンプルプレートにスポットした。その上からマトリックスとして 2,4-dihydrobenzoic acid 0.5 μ l をスポットし結晶化させた。その後、MALDI-TOF MS (陰イオン検出モード) で測定した。セラミドの適量を少量の [クロロホルム:メタノール=2:1 (v/v)] で溶解し、その 0.5 μ l をサンプルプレートにスポットした。その上からマトリックスとして THAP 0.5 μ l をスポットし結晶化させた。その後、MALDI-TOF MS (陽イオン検出モード) で測定した。窒素発光レーザーの波長は 337 nm、イオンチャンバ内の圧力は 3.7×10^{-7} Torr、加速電圧は 20 kV とした。また再現性を向上させるために、256 回のレーザショットで得られる各マススペクトルを平均した。

1-3 PC1P のホスファターゼによる代謝

in vitro 条件として、ウシ小腸由来アルカリホスファターゼを 32 nmol の PC1P、C1P あるいは PA と混合し、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 中で、1 時間、37℃でインキュベートを行った。*ex vivo* 条件として、一晩絶食後のマウスから掻き取った小腸粘膜細胞懸濁液を 32 nmol の PC1P と混合し、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 中で 2 時間、37℃でインキュベートを行った。それぞれの生成物は Bligh & Dyer 法 [25] に従って回収し、[クロロホルム:メタノール=90:6 (v/v)] を展開溶媒に用いる TLC を行った。定量方法としては脂溶性物質がプリムリン試薬を吸着し、UV 照射下で発光するという特性より TLC デンシトメトリー法を選択した。撮影装置 LAS-4000 [富士フイルム株式会社] を用いて UV 照射下 (312 nm) で TLC を撮影し、画像解析ソフト ImageJ を使って画像反転を行い、プリムリン/UV 発光強度を積算し、発光量 (PIV:Pixel-Intensity-Value) を求めた。あらかじめ作成しておいた PIV 検量線を用いて定量を行った。またセラミドについては、MALDI-TOF MS による解析でその構造を確認した。

第2節 実験結果

2-1 GIPC の単離

GIPC は水溶性が高く、一般的な脂質抽出方法である Bligh & Dyer 法では抽出が困難である。そこで Markham らが報告した抽出法を採用した [10]。この方法では分液ロートを用いて分離した [2-プロパノール:ヘキサン:水=55:20:25 (v/v/v)] 混合液の下層 (solvent A) を抽出溶媒とする。キャベツ葉からこの溶媒に可溶性の成分を抽出し、この solvent A 抽出物を [40%メチルアミン:エタノール=1:1 (v/v)] でアルカリ加水分解処理した後、TLC で展開した。展開溶媒には他の脂質成分との分離の具合や Rf 値などを考慮して、[クロロホルム:メタノール:8%アンモニア=45:35:10 (v/v/v)] を用いた。上記の展開溶媒を用いた TLC による精製を複数回行い、純度の高い GIPC を精製した (Fig. 1)。

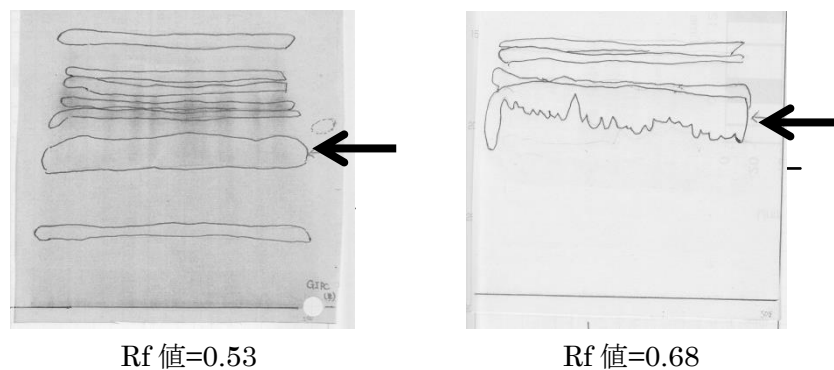


Fig. 1 GIPC の単離

キャベツ葉の solvent A 抽出物をアルカリ処理した後、展開溶媒 [クロロホルム:メタノール:8%アンモニア=45:35:10 (v/v/v)] で展開した。この時の TLC の典型的な結果を左に示す。次に TLC より GIPC 部分のみを抽出し、同展開溶媒で展開した。この時の TLC の典型的な結果を右に示す。この操作を繰り返し、純度の高い GIPC を精製した。矢印は各 TLC における GIPC (Dittmer-Lester 試薬陽性) の位置を示す。

この時得られたキャベツ由来の GIPC を MALDI-TOF MS (陰イオン検出モード) にて解析を行った (Fig. 3A)。植物の GIPC はその極性頭部により、hexose-hexuronic acid-inositol リン酸型 (Fig. 2) と *N*-acetylhexosamine-hexuronic acid-inositol リン酸型 [55] に分けることができる。検出されたイオンのうち、 m/z 1146.6, 1232.7, 1258.7, 1260.7 はそれぞれフィト型スフィンゴシン骨格 ($t18:1$) に、ヒドロキシパルミチン酸 (16:0h)、

ヒドロキシベヘン酸 (22:0h) 、ヒドロキシリグノセリン酸 (24:0h) およびヒドロキシネルボン酸 (24:1h) が結合した hexose-hexuronic acid-inositol リン酸型の GIPC と帰属することが可能であった。この分子種構成は同時に行ったシロイヌナズナの根由来の GIPC (Fig. 3B) と同様に、報告されているシロイヌナズナの GIPC とほぼ同一であった [56] 。

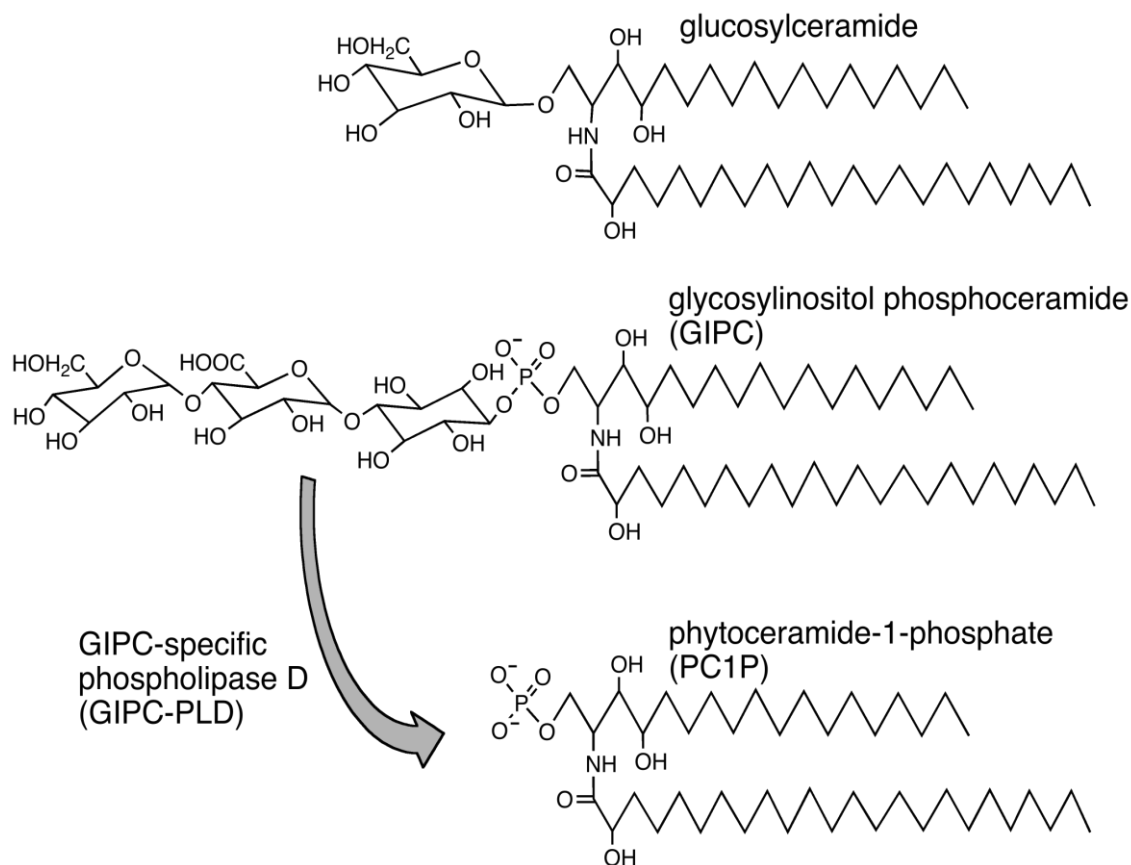


Fig. 2 野菜中のスフィンゴ脂質

GluCer および GIPC および PC1P の構造を示す。植物のスフィンゴ脂質の一般的なセラミド構造はフィトスフィンゴシンと α -ヒドロキシ脂肪酸の組み合わせである。多くの野菜の GIPC はイノシトールに 2 つの糖鎖が結合した構造を持つ。特定の野菜の GIPC では 3 つ以上の糖鎖が結合している構造を持つ。PC1P は GIPC-PLD を介して生成される (第一章)。

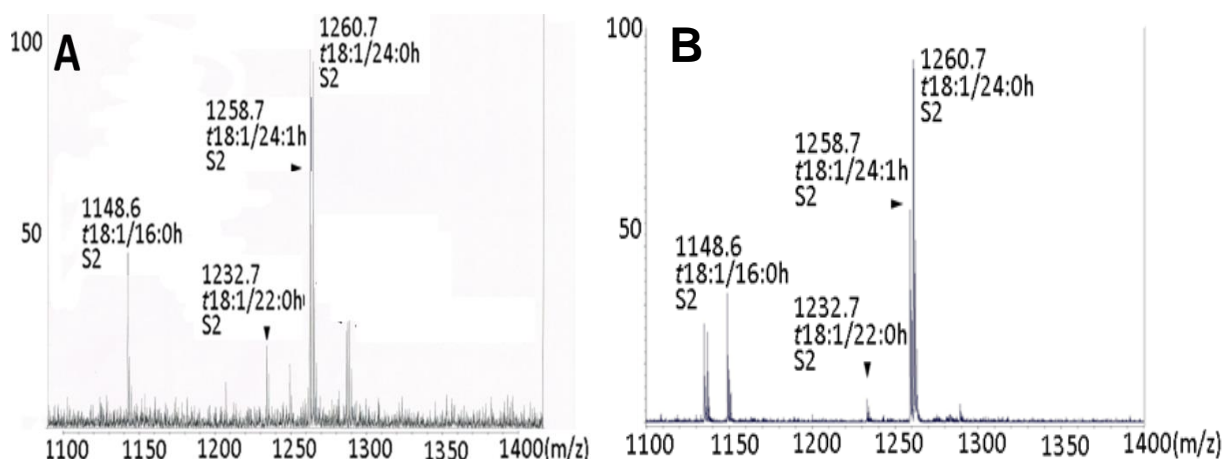


Fig. 3 MALDI-TOF MS (陰イオン検出モード) によるキャベツあるいはシロイヌナズナ由来の GIPC の確認

(A) キャベツの葉から単離した GIPC を MALDI-TOF MS で調べた。GIPC の主な分子種はフィトスフィンゲニン ($t18:1$) と鎖長の異なる α -ヒドロキシ脂肪酸 (16:0h, 22:0h, 24:0h, 24:1h) からなるセラミド構造を持つ。(B) シロイヌナズナの GIPC の主な分子種はフィトスフィンゲニン ($t18:1$) と鎖長の異なる α -ヒドロキシ脂肪酸 (16:0h, 22:0h, 24:0h, 24:1h) からなるセラミド構造を持つ。(A) (B) 検出された GIPC の極性頭部は Fig. 2 に示すように、hexose-hexuronic acid-inositol リン酸型と帰属された。

2-2 食品の GIPC 含量

各食品の solvent A 抽出物をアルカリ処理した後、TLC で展開した。この TLC において、キャベツ由来の GIPC と同様の R_f 値で Dittmer 試薬陽性のバンドを GIPC として各食品の GIPC を単離した。GIPC の同定は MALDI-TOF MS で分子量を確認することで行った。

単離された GIPC をリンモリブデン酸/マラカイトグリーン法により比色定量し、GIPC の平均分子量を 1260 として質量に換算した。Fig. 4 に調べた食品の GIPC 含量 (可食部 100 g 当たりの mg) を示す。GIPC は葉野菜に多い傾向にあり、キャベツ、コマツナ、レタスには 12 mg ~ 22 mg/100 g 含まれていた。一方、根菜類ではやや低く 5 mg ~ 10 mg/100 g であった。これらと比べると、キュウリやトマトなどの果実やタマネギ (鱗茎部)、ジャガイモ (塊茎) では 6 mg/100 g 以下であった。一般にリン脂質は葉野菜に多く、根菜類や果実やタマネギ (鱗茎部)、ジャガイモ (塊茎) で少ない。そのため、GIPC の含量の差はリン脂質含量を反映したのかもしれない。また、市販の小麦粉や精白米には含まれなかった。今回調べてはいないが、麴 (ふすま) や糠の部分にはリン脂質が多く含まれるので、穀類の種皮には検出限界以上の GIPC が存在する可能性がある。GIPC を含むことが確認された野菜の平均 GIPC 含量は 100 g あたり約 17.4 mg であった。一方、肉類・魚介類・卵では検出

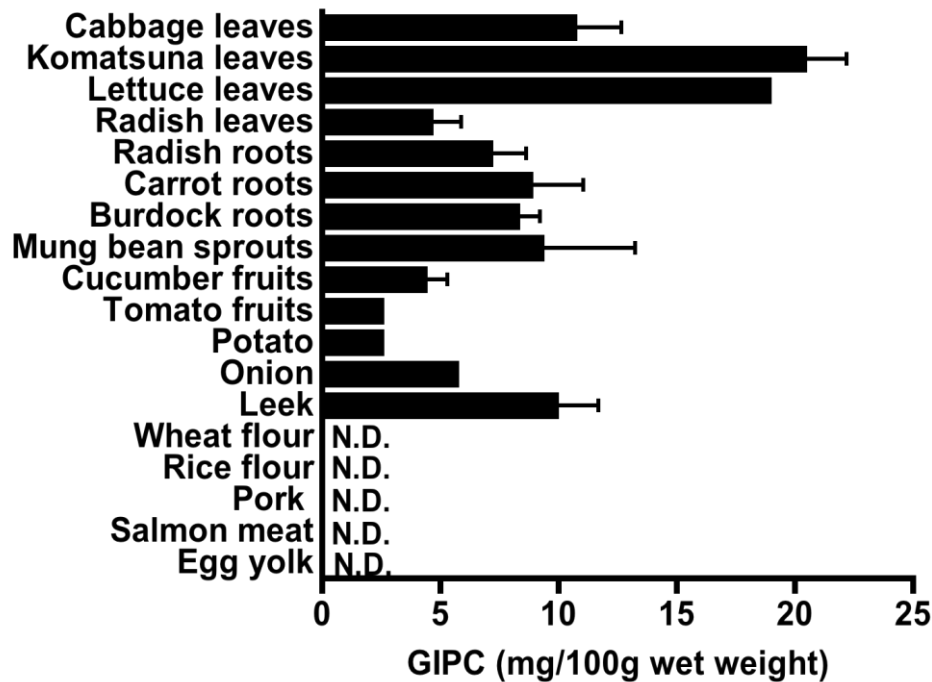
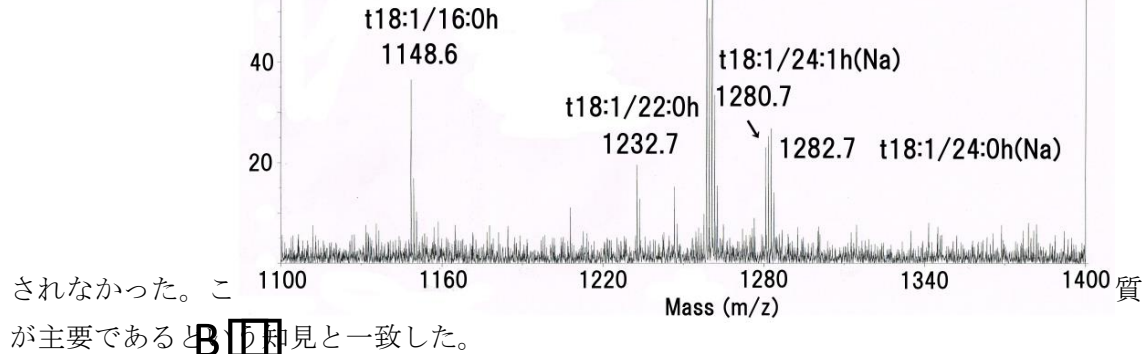


Fig. 4 各食品における GIPC の量と分布

13 種類の植物（キャベツ、コマツナ、レタス、ダイコン、ニンジン、ゴボウ、緑豆モヤシ、キュウリ、トマト、ジャガイモ、タマネギ、ニラ）と小麦、米、豚肉、鮭、卵黄について GIPC の分布と量を調べた。各食品中の GIPC の量は mg/100 g（可食部の湿重量）で示した。N.D.：検出限界以下を示す。データは Mean±S.D. n=3 ~ 4 で示している。一部のデータは第一章 Fig. 18B のものを流用した。

2-3 食品の PC1P 含量

第一章のキャベツ葉を用いた実験で示したように、PC1P は組織のホモジナイズの際に GIPC が加水分解されることにより生じる。そこで、野菜を十分にホモジナイズした後に生じている PC1P について定量を行った。その結果、PC1P はキャベツの葉（5 mg/100 g）、ダイコンの根（2 mg/100 g）、モヤシ（0.3 mg/100 g）で検出されたのみであった（Fig. 5）。その他の野菜や肉類・魚介類・卵・穀類では PC1P は全く検出されなかった。

また、ホモジナイズする前にあらかじめ煮沸した素材では PC1P 含量は数分の 1 に低下する（Fig. 5 グレイの棒グラフ）。このことは、PC1P は特定の野菜（キャベツおよびダイコン）を生で摂取したときにのみ生じるスフィンゴリン脂質であることを意味している。

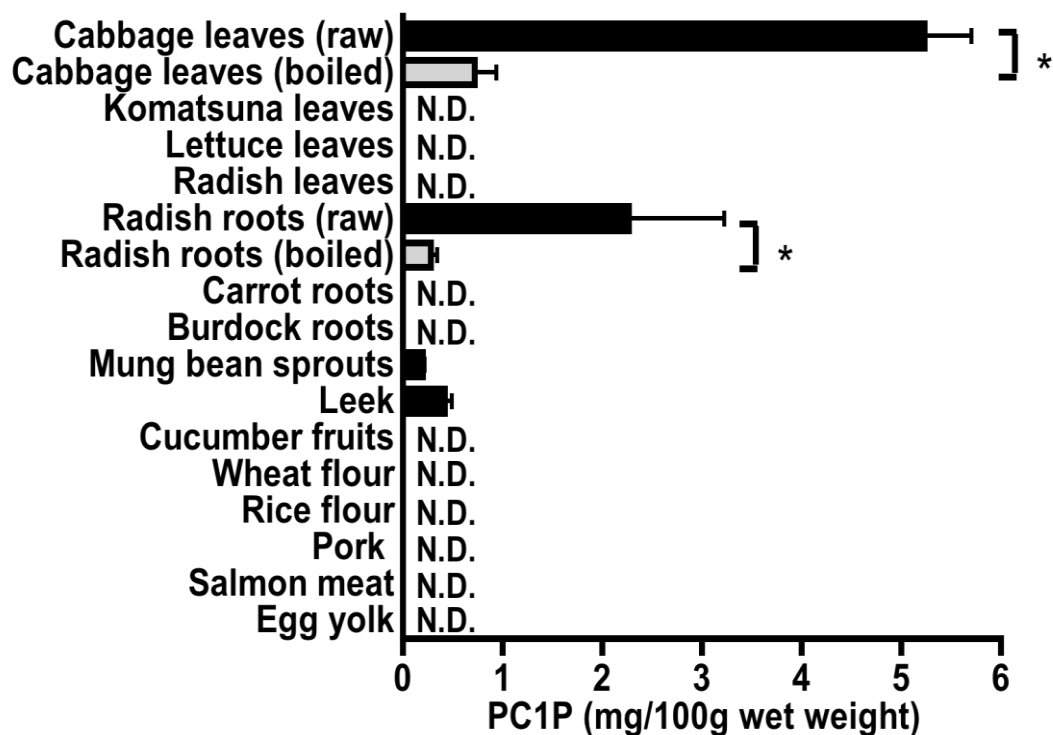


Fig. 5 各食品における PC1P の量と分布

9 種類の植物（キャベツ、コマツナ、レタス、ダイコン、ニンジン、ゴボウ、緑豆モヤシ、ニラ、キュウリ）と小麦、米、豚肉、鮭、卵黄について PC1P の分布と量を調べた。またキャベツ葉とダイコンの根部分を煮沸したものについて調べ、グレイの棒グラフで示した。食品中の PC1P の量は mg/100 g（可食部の湿重量）で示した。* は各項目の比較で有意差あり（ $P < 0.05$ ）を示す。N.D. : 検出限界以下を示す。データは Mean \pm S.D. n=3 ~ 4 で示している。一部のデータは第一章 Fig. 18C のものを流用した。

2-4 TLC デンシメトリー法によるセラミドの分析方法の確立

C1P はリン酸化脂質ホスファターゼによりセラミドへ消化されることが知られている [57]。そこで、消化管で PC1P を消化する酵素の候補の一つとして、アルカリホスファターゼを想定し、フィトセラミドへの消化について調べることにした (Fig. 6)。

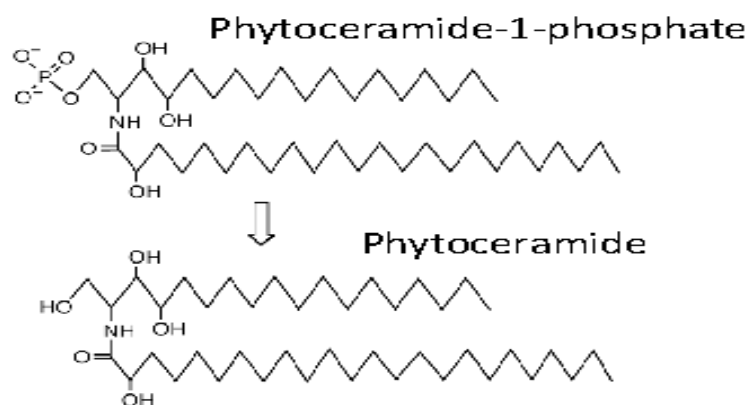


Fig. 6 想定される PC1P の消化経路

まずセラミドの TLC デンシトメトリー法による定量法を開発した。この方法は脂質検出方法であるプリムリン/UV 発色を TLC 上で行い、撮影されたデジタル写真から発色強度を求め、検量線からセラミド含量を求めるものである。検量線作成のため、10 nmol ~ 50 nmol のセラミドを TLC にスポット後、展開し、プリムリン/UV で発色させ、画像を撮影した (Fig. 7A)。画像解析ソフトを使用して各スポットのプリムリン/UV 発光強度を発光量 (PIV : Pixel-Intensity-Value) として求めた。PIV を基準にした標準品セラミドの検量線を Fig. 7B に示す。セラミドのスポットの PIV は、40 nmol までの範囲で用量依存的に増加することが確認された (Fig. 7B)。発色強度 PIV と単位面積あたりに塗布する脂質の量との相関性には飽和があり、40 nmol 以上では直線的に増加はしなかった。

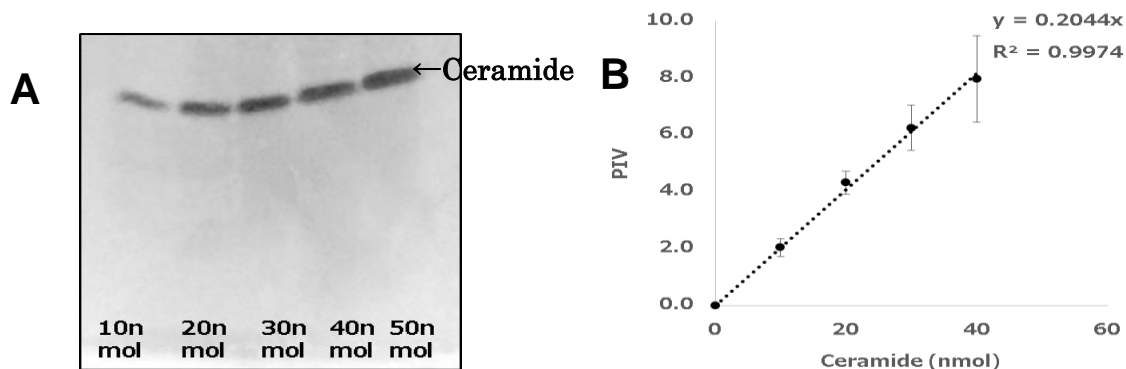


Fig. 7 プリムリン/UV 蛍光発色強度を利用した標準品セラミドの検量線の作成

(A) 10 nmol ~ 50 nmol の濃度のセラミドを TLC にスポットし、展開溶媒 [クロロホルム: メタノール=90:6 (v/v)] で展開した。この TLC にプリムリンを吹きかけ、UV 照射下で LAS-4000 を用いて撮影して得られた画像の一例を示す。(B) (A) のセラミドの各濃度のスポットにおいて画像解析ソフト Image-J を用いて PIV を計算し、検量線を作成した。データは Mean ± S. D. n=3 で示している。

2-5 ウシ小腸由来アルカリホスファターゼによる PC1P の消化

キャベツ由来の PC1P とウシ小腸由来アルカリホスファターゼを用いて PC1P の消化について分析を行った。この時、ポジティブコントロールとして用いた C1P、PA はそれぞれセラミド、ジアシルグリセロール (DG) に代謝された (Fig. 8A)。同条件下で PC1P は Rf 値 (0.16) 部分の脂質に代謝された (Fig. 8A)。この脂質は MALDI-TOF MS 解析よりフィトセラミドと同定された (Fig. 8B)。さらに PC1P は C1P や PA がそれぞれセラミドおよび DG へ消化される効率と同程度にフィトセラミドに消化されることも分かった (Fig. 8C)。

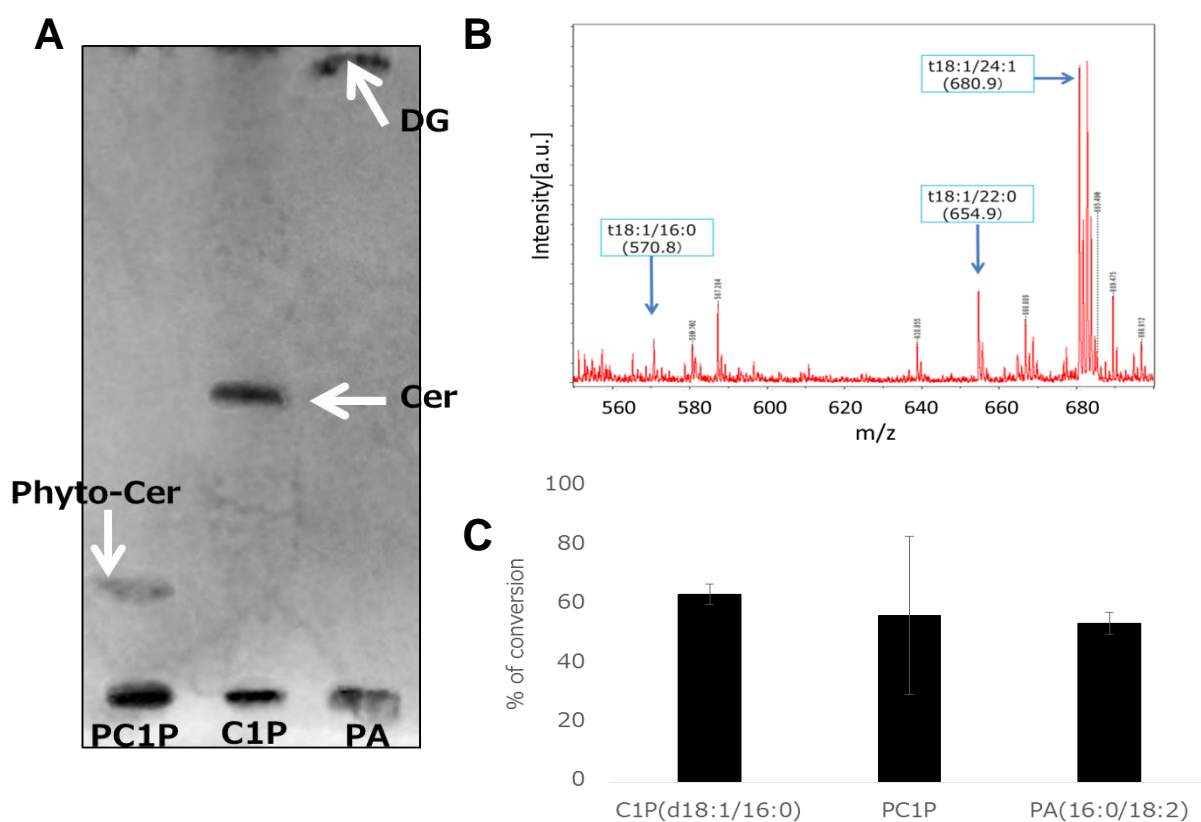


Fig. 8 ウシ小腸由来アルカリホスファターゼによる PC1P の消化

(A) PC1P をウシ小腸由来のアルカリホスファターゼで 1 時間、37°C でインキュベートした。生じた脂質を展開溶媒 [クロロホルム:メタノール=90:6 (v/v)] を用いた TLC にて分離した。また、C1P と PA も同様にアルカリホスファターゼによる処理を行った。(B) (A) で得た PC1P 代謝物 (Rf0.16) の MALDI-TOF MS を示した。(C) (A) で得た C1P、PC1P、PA の代謝脂質を TLC デンシトメリー法で定量し、代謝変換率で示した。データは Mean±S. D. n=3 で示している。

2-6 マウス小腸粘膜による PC1P の消化

キャベツ由来の PC1P とマウス小腸粘膜を用いて PC1P の消化性を調べた。その結果、この実験においても PC1P の用量依存的にフィトセラミドが生じることが分かった (Fig. 9A)。フィトセラミドは 2-2 同様に MALDI-TOF MS で確認した (Fig. 9B)。以上の結果より PC1P は小腸粘膜のアルカリホスファターゼにより脱リン酸化され、フィトセラミドに消化されることが確認された。

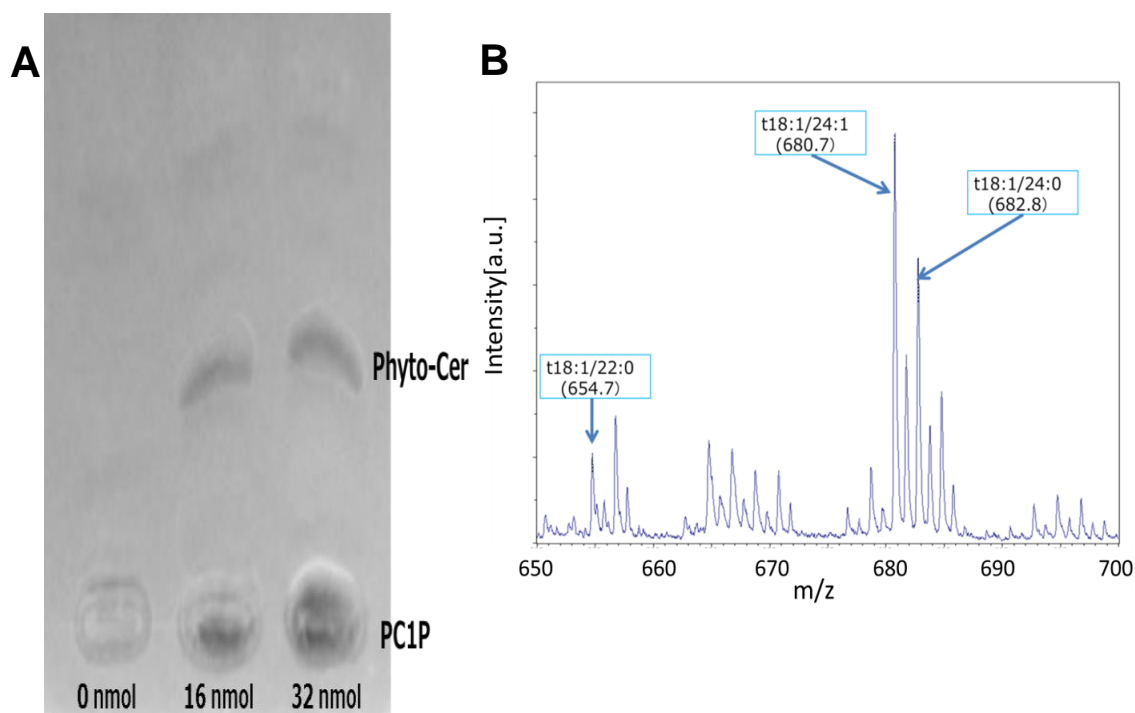


Fig. 9 マウス小腸粘膜による PC1P の消化

(A) マウス小腸粘膜を掻き取り、懸濁液を調製した。調製した懸濁液と PC1P を 2 時間、37°C で振盪しながらインキュベートすることで反応させ、抽出液を展開溶媒 [クロロホルム:メタノール=90:6 (v/v)] で展開した。

(B) (A) で得た PC1P 代謝物 (Rf 0.16) の MALDI-TOF MS を示した。

第3節 考察

植物に含まれる主要なスフィンゴ脂質は GIPC と GluCer である。例えばシロイヌナズナ (葉抽出液) において GIPC、GluCer はそれぞれ全スフィンゴ脂質の約 64%, 34% の割合を占めている [10]。GluCer は保湿性向上や美肌効果が期待される食品素材とされ、特定保健用食品としての利用申請がなされ、我々の体に対する影響が調べられている [58]。また、摂取量や消化吸収に関する知見も蓄積しつつある [54, 59]。一方、GIPC については水溶性という特性から抽出が難しく、解析が遅れており、食品としての摂取量や消化吸収についての報告は私の知る限りない。そこで、本研究では食品に含まれる GIPC 量を調べた。17 種類の食品について GIPC 含量を調べた結果、GIPC は予想された様に動物組織には存在せず、野菜に含まれていることが分かった (Fig. 4)。調べた全ての野菜が 100 g あたり、3 mg ~ 21mg の GIPC を有することから、このクラスのスフィンゴリン脂質は、ほとんどの植物が構成的に保持している成分であると思われる。今回調べた野菜の平均 GIPC 含量は 100 g あたり約 17.4 mg であった。国民健康・栄養調査 (厚生労働省調べ, 平成 25 年) によると、日本人における野菜 1 日当たり平均摂取量は 283.1 g であるので、1 日の GIPC 摂取量は約 50 mg と推定される。これは前述の GluCer と同程度であった [52]。経口摂取された GluCer はそのままの形で機能発現するのではなく、生体内で分解されてできるスフィンゴイド塩基が内因性のスフィンゴ脂質代謝を高めることで、保湿性の関わるスフィンゴ脂質の一つであるセラミドが合成され、皮膚の保湿としての機能に繋がっているとされている [54]。残念ながら、本研究では GIPC の消化性については調べていないので、GIPC の機能性については全く不明である。もし、我々が有する消化酵素や腸内細菌が有する消化酵素により GIPC がセラミドにまで消化されるならば、GluCer 様の作用を持つかもしれない。今後、GIPC の消化性や機能について *in vivo* および *in vitro* の実験を行い、これらのことを調べる必要がある。

第一章で GIPC を特異的に加水分解し、PC1P を生成する酵素として GIPC-PLD を見出し、この酵素活性が組織をホモジナイズする際に活性化することを報告した。食品を咀嚼することは組織をホモジナイズすることとよく似たプロセスであり、GIPC から GIPC-PLD を介した PC1P への変換は食品の咀嚼と消化のプロセスでも起こると考えられる。例えば、野菜サラダを食べる時、咀嚼により GIPC-PLD が活性化され、野菜に含まれる GIPC が消化管で PC1P に変換されると考えられる。今回調べた 14 種の食品の中でホモジナイズ、すなわち咀嚼することで検出限界以上の PC1P を生成した食品はキャベツの葉・ダイコンの根・モヤシのみであった (Fig. 5)。これらは GIPC-PLD 活性が高い野菜、部位であった [第一章 Fig. 17]。生じた PC1P 量はキャベツおよびダイコンで食品 100 g あたり、それぞれ 5 mg および 2.3 mg であった。また PC1P は煮沸すると GIPC-PLD が低下し、ほとんど生

じない成分である。仮に PC1P に何らかの機能性が見出され、これを含む素材を機能性食品として利用する場合にはキャベツサラダやダイコンおろしなど生で食べる方法が良いと思われる。昔から生のキャベツやダイコンおろしは消化管の機能障害に効果を示すといわれる料理である。PC1P が消化管機能に何らかの影響があるのかもしれない。植物におけるスフィンゴリン脂質については消化吸收経路だけでなく消化管細胞への影響についても調べる必要があると思われる。

セラミドと C1P はそれぞれ細胞の死と生を決定する細胞内因子であること [60] から活発に研究されている。C1P はセラミドのリン酸化によって生じ、lipid phosphate phosphatase (LPP) という脱リン酸化酵素により、セラミドに戻されるという代謝経路が知られている。このタイプの酵素は LPP-1、-2、-3 の 3 タイプが知られ、いずれも膜酵素で、細胞外からやってくるリン酸モノエステル型脂質に作用するとされる [57]。一方、小腸にはアルカリホスファターゼが存在し、幅広い基質を脱リン酸化している。これらのことから、私は摂取した PC1P が小腸のアルカリホスファターゼによりフィトセラミドへと代謝される可能性についてウシ小腸由来のホスファターゼを用いて調べた。その結果、PC1P がフィトセラミドへ代謝されることが分かった(Fig. 8A, B)この代謝効率は C1P や PA が脱リン酸化を受ける効率と同程度であった (Fig. 8C)。同様にマウス小腸由来粘膜細胞懸濁液を用いた研究でも PC1P がフィトセラミドへ代謝されることが分かった (Fig. 9)。今後、PC1P を加えた食餌を使用してマウスにおける *in vivo* の実験を試みていく必要があるが、おそらくこの脱リン酸化が PC1P の主要な消化経路であると思われる。植物由来 GluCer はセラミドに分解された後、セラミダーゼによりスフィンゴシンと脂肪酸にさらに分解を受けることが知られている [53]。おそらく、PC1P 由来のフィトセラミドもその分解経路を辿るのではないかと思われる。この点も今後の検討課題である。

植物組織において、PC1P がフィトセラミドに代謝されるかどうかは不明であるが、アルカリホスファターゼ活性を持つタンパク質がシロイヌナズナに存在する [At5g1725, At2g22530] ことより、その可能性はあると考えられる。植物組織において PC1P がフィトセラミドに代謝されるならば、植物に広範に豊富に存在する GIPC は PC1P を介してフィトセラミド、リン酸、イノシトールグリコシドに分解されることとなる。第一章で触れた GIPC の植物内での役割を考える上でも、植物細胞における PC1P の代謝の研究は重要な意義があるものと思われる。

今回私は抽出が難しく解析が進んでいなかった GIPC の単離方法を検討した。様々な食品における GIPC と PC1P の分布と量を調べ、1 日推定摂取量を算定した。次に *in vitro*, *ex vivo* において PC1P がアルカリホスファターゼによりフィトセラミドへの代謝されることが見出した。GIPC の消化性やフィトセラミドの体内での吸収率などは不明であり、今後検

討が必要である。GIPC や PC1P といった食品に含まれるスフィンゴ脂質が我々の体に影響を及ぼし得るかどうかを解明する上でもこの点の検討が必要である。

総括

この論文に示した一連の研究はキャベツ脂質における未知リン脂質Xの検出で始まった。私はこのリン脂質Xを弱アルカリ耐性試験、Phos-tagを用いたMALDI-TOF MS、GC-MSによる*N*-アシル鎖の解析、TOF MSによる精密質量分析から4種の α -ヒドロキシ脂肪酸(C16:0, C22:0, C24:0, C24:1)を含有するPC1Pと決定した。特に、リン酸捕獲試薬のPhos-tagと複合体を形成することはこの構造決定において最も重要な情報であり、リン脂質Xがリン酸モノエステル型スフィンゴ脂質であることの決定的な証拠となった。私の知る限り、これまでに植物組織中にこのクラスのスフィンゴリン脂質が存在することを報告した例はない。植物におけるPC1Pの生成経路はセラミドのリン酸化ではなく、GIPCの加水分解であった。動物細胞ではC1Pはセラミドのセラミドキナーゼによるリン酸化により生じ[35, 36]、植物細胞でもセラミドキナーゼのオルソログは同定されている[37, 38i]。これらの報告よりPC1Pの生成経路はセラミドのリン酸化の可能性が高いと考えられたため、予想外の結果であった。本研究で見出したGIPCを加水分解する酵素はGIPC特異的にそのD位置で加水分解することから、私はこれを「GIPC-PLD」と命名した。これまでにGIPCやIPCの分解酵素として知られている酵素は、酵母[32]・クリプトコッカス種[33]の(G)IPCをセラミド部分とリン酸との間(C位置)で加水分解する酵素IPC-PLCのみであり、(G)IPCをD位置で加水分解する酵素の報告はない。植物ではPCを分解してPAを生成するPLD(PC-PLD)がよく知られているが、GIPC-PLDはPCに作用せず、GIPCに特異的であるなど多くの点でPC-PLDとは異なる。本酵素はこれまで知られていない反応を触媒する新規な酵素と考えられる。

GIPC-PLD活性を特徴づけるために様々な植物の分布を調べた。その結果、外葉より内葉、茎・葉より根、根の中では成熟段階より発芽段階で活性が高かった。このことからGIPC-PLD活性は植物の成長に関与している可能性が示唆された。植物におけるGIPC-PLDの分布を調べたところ、活発に成長している部分で高い活性が検出された。このことはGIPC-PLD活性が植物の成長に関与することを示唆している。GIPCにはGPIアンカーとしての役割[40, 41]やシグナル伝達物質の前駆体としての役割が想定されている[39]。GIPC-PLDが作用すれば、アンカー型タンパク質を遊離させることも、報告されているシグナル伝達物質候補を産生させることも可能である。そのような機能が植物の成長に影響するのかもしれない。現段階では未だクローニングするには至っていないが、本酵素の生理機能を解明すれば作物収量の増加や新たな作用に基づく農薬あるいは抗菌剤の開発に繋がる可能性もある。

近年、スフィンゴリン脂質の一つであるSphMやGluCerは食品機能性成分として注目されており、特に皮膚バリア向上機能が報告されている。1日の摂取量はそれぞれ50-110mg、60-80mg程度と報告されている[52]。また、皮膚バリア向上性作用の機構は体内で分解され生じるスフィンゴイド塩基が内在性のスフィンゴ脂質代謝を高め、保湿性の関与するス

フィンゴ脂質の一つであるセラミドが合成されることとされている。本研究で GIPC は野菜に普遍的に存在し、1日の摂取量は推定約 50 mg であることが分かった。GIPC の消化吸収は調べていないが、GIPC の加水分解物である PC1P はアルカリホスファターゼによりフィトセラミドまで分解されることが分かった。フィトセラミドが同様に体内で内在性のスフィンゴ脂質代謝を高めるならば、GIPC は同様に食品機能性成分として利用出来るかもしれない。

動物において SphM は主要なリン脂質であり、セラミドや C1P、S1P のようなシグナル性伝達物質の前駆体である。近年、スフィンゴ脂質代謝研究より多発性硬化症の治療薬、フィンゴリモド (S1P 受容体の機能的アンタゴニスト) が開発されるなど、スフィンゴ脂質代謝は創薬標的として重要な研究領域となっている。本研究で明らかとなった植物で生じる PC1P や未利用の GIPC は創薬、化粧品、機能性食品の領域でさらに研究すべき脂質分子となるかもしれない。

参考文献

- [1] Aoki, J., Inoue, A. & Okudaira, S. (2008) Two pathways for lysophosphatidic acid production, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1781, 513-518.
- [2] Akira, T. (2014) Phospholipid mediators that exert a physiological action in the digestive tube lumen, *Journal of Lipid Nutrition*. 23, 53-61.
- [3] Choi, J. W., Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C. W., Mutoh, T., Lin, M. E., Teo, S. T., Park, K. E., Mosley, A. N. & Chun, J. (2010) LPA Receptors: Subtypes and Biological Actions, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 50, 157-186.
- [4] Ishii, S., Noguchi, K. & Yanagida, K. (2009) Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors, *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 89, 57-65.
- [5] Hla, T. (2004) Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate, *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 15, 513-520.
- [6] Nagaoka, Y., Otsuki, K., Fujita, T. & Uesato, S. (2008) Effects of Phosphorylation of Immunomodulatory Agent FTY720 (Fingolimod) on Antiproliferative Activity against Breast and Colon Cancer Cells, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 31, 1177-1181.
- [7] Ohlrogge, J. & Browse, J. (1995) Lipid Biosynthesis, *The Plant Cell*. 7, 957-970.
- [8] Uemura, M. & Yoshida, S. (1984) Involvement of Plasma Membrane Alterations in Cold Acclimation of Winter Rye Seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma) , *Plant Physiol*. 75, 818-826.
- [9] Spassieva, S. & Hille, J. (2003) Plant Sphingolipids Today - Are They Still Enigmatic?, *Plant Biology*. 5, 125-136.
- [10] Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B. & Jaworski, J. G. (2006) Separation and Identification of Major Plant Sphingolipid Classes from Leaves, *The Journal of Biological Chemistry*. 281, 26684-26694.

- [11] Nagano, M., Ishikawa, T., Ogawa, Y., Iwabuchi, M., Nakasone, A., Shimamoto, K., Uchimiya, H. & Kawai-Yamada, M. (2014) Arabidopsis Bax inhibitor-1 promotes sphingolipid synthesis during cold stress by interacting with ceramide-modifying enzymes, *Planta*. 240, 77-89.
- [12] Lynch, D. V., Chen, M. & Cahoon, E. B. (2009) Lipid signaling in Arabidopsis: no sphingosine? No problem!, *Trends in Plant Science*. 14, 463-466.
- [13] Tanaka, T., Tsutsui, H., Hirano, K., Koike, T., Tokumura, A. & Satouchi, K. (2004) Quantitative analysis of lysophosphatidic acid by time-of-flight mass spectrometry using a phosphate-capture molecule, *The Journal of Lipid Research*. 45, 2145-2150.
- [14] Morishige, J., Urikura, M., Takagi, H., Hirano, K., Koike, T., Tanaka, T. & Satouchi, K. (2010) A clean-up technology for the simultaneous determination of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry using a phosphate-capture molecule, *Phos-tag, Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 24, 1075-1084.
- [15] Tanaka, T., Horiuchi, G., Matsuoka, M., Hirano, K., Tokumura, A., Koike, T. & Satouchi, K. (2009) Formation of lysophosphatidic acid, a wound-healing lipid, during digestion of cabbage leaves, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 73, 1293-1300.
- [16] Tanaka, T., Kassai, A., Ohmoto, M., Morito, K., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Urikura, M., Morishige, J., Satouchi, K. & Tokumura, A. (2012) Quantification of Phosphatidic Acid in Foodstuffs Using a Thin-Layer-Chromatography-Imaging Technique, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 4156-4161.
- [17] Adachi, M., Horiuchi, G., Ikematsu, N., Tanaka, T., Terao, J., Satouchi, K. & Tokumura, A. (2011) Intragastrically Administered Lysophosphatidic Acids Protect Against Gastric Ulcer in Rats Under Water-Immersion Restraint Stress, *Digestive Diseases and Sciences*. 56, 2252-2261.
- [18] Tanaka, T., Morito, K., Kinoshita, M., Ohmoto, M., Urikura, M., Satouchi, K. & Tokumura, A. (2012) Orally administered phosphatidic acids and lysophosphatidic acid ameliorates aspirin-induced stomach ulcer in mice, *Digestive Diseases and Sciences*. 58, 950-958.

- [19] Worrall, D., Liang, Y. K., Alvarez, S., Holroyd, G. H., Spiegel, S., Panagopoulos, M., Gray, J. E. & Hetherington, A. M. (2008) Involvement of sphingosine kinase in plant cell signaling, *Genes & Development*. 56, 64-72.
- [20] Liang, H., Yao, N., Song, J. T., Luo, S., Lu, H. & Greenberg, J. T. (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants, *Genes & Development*. 17, 2636-2641.
- [21] Li, M., Hong, Y. & Wang, X. (2009) Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791, 927-935.
- [22] Powner, D. J. & Wakelam, M. J. (2002) The regulation of phospholipase D by inositol phospholipids and small GTPases, *FEBS Letters*. 531, 62-64.
- [23] Wang, X. (2004) Lipid signaling, *Current Opinion in Plant Biology*. 7, 329-336.
- [24] 五訂増補食品成分表 2008 資料編 女子栄養大学出版部
- [25] Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37, 911-917.
- [26] Chalvardjian, A. & Rudnicki, E. (1970) Determination of lipid phosphorus in the nanomolar range, *Analytical Biochemistry*. 36, 225-230.
- [27] Tanaka, T., Kida, T., Imai, H., Morishige, J., Yamashita, R., Matsuoka, H., Uozumi, S., Satouchi, K., Nagano, M. & Tokumura, A. (2013) Identification of a sphingolipid-specific phospholipase D activity associated with the generation of phytoceramide-1-phosphate in cabbage leaves, *FEBS Journal*. 280, 3797-3809.
- [28] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G.T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, *Analytical Biochemistry*. 150, 76-85.
- [29] Davidson, F. M. & Long, C. (1958) The structure of the naturally occurring phosphoglycerides. 4. Action of cabbage-leaf phospholipase D on ovolécithin and related substances, *Biochemical Journal*. 69, 458-466.

- [30] Imai, H., Yamamoto, K., Shibahara, A., Miyatani, S. & Nakayama, T. (2000) Determining double-bond positions in monoenoic 2-hydroxy fatty acid of glucosylceramides by gas chromatography–mass spectrometry, *Lipids*. 35, 233-236.
- [31] Urikura, M., Morishige, J., Tanaka, T. & Satouchi, K. (2012) Phosphatidic acid production in the processing of cabbage leaves, *Journal of Agricultural and Food Sciences*. 60, 11359-11365.
- [32] Sawai, H., Okamoto, Y., Luberto, C., Mao, C., Bielawska, A., Domae, N., & Hannun, Y. A. (2000) Identification of ISC1 (YER019w) as inositol phosphosphingolipid phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*. 275, 39793-39798.
- [33] Henry, J., Guillotte, A., Luberto, C. & Poeta, M. D. (2011) Characterization of inositol phospho-sphingolipid-phospholipase C1 (Isc1) in *Cryptococcus neoformans* reveals unique biochemical features, *FEBS Letters*. 585, 635-640.
- [34] Cacas, J. L., Buré, C., Furt, F., Maalouf, J. P., Badoc, A., Cluzet, S., Schmitter, J. M., Antajan, E. & Mongrand, S. (2013) Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity, *Phytochemistry*. 96, 191-200.
- [35] Kihara, A., Mitsutake, S., Mizutani, Y. & Igarashi, Y. (2007) Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate, *Progress in Lipid Research*. 46, 126-144.
- [36] Bornancin, F. (2011) Ceramide kinase: the first decade, *Cellular Signalling*. 6, 999-1008.
- [37] Worrall, D., Liang, Y. K., Alvarez, S., Holroyd, G. H., Spiegel, S., Panagopulos, M., Gray, J. E. & Hetherington, A. M. (2008) Involvement of sphingosine kinase in plant cell signaling, *Plant Journal*. 56, 64-72.
- [38] Bi, F. C., Zhang, Q. F., Liu, Z., Fang, C., Li, J., Su, J. B., Greenberg, J. T., Wang, H. B. & Yao, N. (2011) A conserved cysteine motif is critical for rice ceramide kinase activity and function, *PloS ONE*. 6, e18079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone>.

0018079.

[39] Smith, C. K. & Fry, S. C. (1999) Biosynthetic origin and longevity in vivo of -D-mannopyranosyl- (1→4) -α-D-glucuronopyranosyl- (1→2) -myo-inositol, an unusual extracellular oligosaccharide produced by cultured rose cells, *Planta*. 210, 150-156.

[40] Oxley, D. & Bacic, A. (1999) Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96, 14246-14251.

[41] Morita, N., Nakazato, H., Okuyama, H., Kim, Y. & Thompson, G. A. Jr. (1996) Evidence for a glycosylinositolphospholipid-anchored alkalinephosphatase in the aquatic plant *Spirodela oligorrhiza*, *Biochimica et Biophysica Acta*. 1290, 53-62.

[42] Showalter, A. M. (2001) Arabinogalactan-protein: structure, expression and function, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58, 1399-1417.

[43] Ellis, M., Egelund, J., Schultz, C. J. & Bacic, A. (2010) Arabinogalactan-protein: Key regulators at the cell surface? , *Plant Physiology*. 153, 403-419.

[44] Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J. E., Tsegaye, Y., Dunn, T. M., Wang, G. L., Bellizzi, M., Parsons, J. F., Morrissey, D., Bravo, J. E., Lynch, D. V. & Xiao, S. (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*, *Plant Cell*. 20, 3163-3179.

[45] Coderch, L., López, O., de la Maza, A. & Parra, J. L. (2003) Ceramides and skin function, *American Journal of Clinical Dermatology*. 4, 107-129.

[46] Tatsuya, S. (2013) Digestion and Absorption of Sphingolipids as Functional Food Components, *Japan Society of Nutrition and Food Science*. 66, 177-183.

[47] Schmelz, E. M., Dillehay, D. L., Webb, S. K., Reiter, A., Adams, J. & Merrill, A. H. (1996) Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,

2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis, *Cancer research*. 56, 4936-4941.

[48] Aida, K., Kinoshita, M., Tanji, M., Sugawara, T., Tamura, M., Ono, J., Ueno, N. & Ohnishi, M. (2005) Prevention of Aberrant Crypt Foci Formation by Dietary Maize and Yeast Cerebrosides in 1,2-Dimethylhydrazine-treated Mice, *Journal of Oleo Science*. 54, 45-49.

[49] Duan, R. D. & Nilsson, A. (2009) Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development, *Progress in Lipid Research*. 48, 62-72.

[50] Uchiyama, T., Nakano, Y., Ueda, O., Mori, H., Nakashima, M., Noda, A., Ishizaki, C. & Mizoguchi, M. (2008) Oral Intake of Glucosylceramide Improves Relatively. Higher Level of Transepidermal Water Loss in Mice and Healthy Human, *Journal of Health Science*. 54, 559-566.

[51] Ideta, R., Sakuta, T., Nakao, Y. & Uchiyama, T. (2011) Orally Administered Glucosylceramide Improves the Skin Barrier Function by Upregulating Genes Associated with the Tight Junction and Cornified Envelope Formation, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 75, 1516-1523.

[52] Yunoki, K., Ogawa, T., Ono, J., Miyashita, R., Aida, K., Oda, Y. & Onishi, M. (2008) Analysis of Sphingolipid Classes and Their Contents in Meals, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 72, 222-225.

[53] Sugawara, T., Kinoshita, M., Ohnishi, M., Nagata, J. & Saito, M. (2003) Digestion of maize sphingolipids in rats and uptake of sphingadienine by Caco-2 cells, *Journal of Nutrition*. 133, 2777-2782.

[54] Duan, J., Sugawara, T., Hirose, M., Aida, K., Sakai, S., Fujii, A. & Hirata, T. (2012) Dietary sphingolipids improve skin barrier functions via the upregulation of ceramide synthases in the epidermis, *Experimental Dermatology*. 6, 448-452.

[55] Buré, C., Cacas, J. L., Mongrand, S. & Schmitter, J. M. (2014) Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry,

Analytical and Bioanalytical Chemistry. 406, 995-1010.

[56] Imai, H. & Yanagawa, D. (2016) Plant sphingolipids : recent advances in the analyses of their structural diversity and metabolic pathway, *Journal of Japanese Biochemical Society*. 88, 94-104.

[57] Brindley, D. N. (2004) Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer, *Journal of Cellular Biochemistry*. 92, 900-912.

[58] Aida, K. (2007) Food Functionality of Plant Glucosylceramide -Prevention of Aberrant Crypt Foci Formation by Dietary Plant and Fungal Glucosylceramides in 1, 2-Dimethylhydrazine-treated Mice, *Japan Oil Chemists' Society*. 7, 141-149.

[59] Hasegawa, T., Shimada, H., Uchiyama, T., Ueda, O., Nakashima, M. & Matsuoka, Y. (2011) Dietary Glucosylceramide Enhances Cornified Envelope Formation via Transglutaminase Expression and Involucrin Production, *Lipid*. 49, 529-535.

[60] Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Ishikura, H., Umehara, H. & Domae, N. (1995) Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells, *Journal of Physiology and Biochemistry*. 270, 27326-27331.

[61] Kida, T., Itoh, A., Kimura, A., Matsuoka, H., Imai, H., Kogure, K., Tokumura, A. & Tanaka, T. (2017) Distribution of glycosylinositol phosphoceramide-specific phospholipase D activity in plants, *Journal of Biochemistry*. 161, 187-195.

[62] 喜田孝史, 木村朱里, 伊藤葵, 山下量平, 小暮健太郎, 徳村彰, 田中保 (2016) 食品に含まれるグリコシルイノシトールホスホセラミドおよびフィトセラミド-1-リン酸, *脂質栄養学*. 25, 75-85.

謝辞

本研究にご協力いただきました徳島大学薬学部衛生薬学分野の山下量平氏、松岡久嗣氏、伊藤葵氏、木村朱里氏、藤原美奈氏をはじめ、卒業生、在校生の皆様、ならびに甲南大学理工学部生物学科植物生化学研究室 今井博之教授に感謝いたします。本研究の遂行の機会を与えていただき、ご指導ご鞭撻を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部衛生薬学研究室 小暮健太郎教授および徳島大学名誉教授、安田女子大学衛生薬学研究室 徳村彰教授に感謝いたします。本研究の実施ならびに論文作成に際して御指導賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部衛生薬学研究室 田中保准教授に感謝いたします。

2017 年 7 月